



HAL
open science

Étude de la polymérisation enzymatique de la malolactonates en présence de lipases

Hubert Casajus

► **To cite this version:**

Hubert Casajus. Étude de la polymérisation enzymatique de la malolactonates en présence de lipases. Polymères. Université de Rennes, 2017. Français. NNT : 2017REN1S090 . tel-01729161

HAL Id: tel-01729161

<https://theses.hal.science/tel-01729161>

Submitted on 12 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Chimie

Ecole doctorale : Matière Molécules et Matériaux

Hubert CASAJUS

Préparée à l'unité de recherche 6226 - ISCR
Institut des Sciences Chimiques de Rennes (UFR Sciences et Propriété
de la Matière)

**Etude de la
polymérisation
enzymatique de
malolactonates
en présence de
lipases**

**Thèse soutenue à Rennes
le 11 décembre 2017**

devant le jury composé de :

Olivier COULEMBIER

Professeur Université de Mons / *rapporteur*

Eric DUBREUCQ

Professeur Montpellier SupAgro / *rapporteur*

Christine VAUTHIER

Directrice de recherche CNRS, Institut Galien Paris
sud / *présidente du jury*

Laurent FONTAINE

Professeur Université du Maine / *examineur*

Caroline NUGIER-CHAUVIN

Maître de conférence ENSCR / *directrice de thèse*

Sandrine CAMMAS-MARION

Chargée de recherche CNRS, ENSCR / *co-directrice
de thèse*

*« [...] Hâtez-vous lentement, et, sans perdre courage,
Vingt fois sur le métier remettez votre ouvrage :
Polissez-le sans cesse et le repolissez ;
Ajoutez quelquefois, et souvent effacez. [...] »*

Nicolas Boileau, *L'Art poétique*, **1674**

Remerciements

Merci au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche d'avoir financé mes travaux de thèse.

Merci à Eric Dubreucq et Olivier Coulembier d'avoir accepté de rapporter mes travaux de thèse. Bonne lecture ! Merci à Christine Vauthier et Laurent Fontaine d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse (parfois dans la précipitation).

Merci et pardon à Anne Corlu qui avait accepté d'être membre de mon jury mais qui finalement ne pourra pas en faire partie, pour des raisons extérieures à nos volontés.

Merci à la nouvelle école doctorale 3M et bravo pour sa nouvelle expansion territoriale. Merci pour votre flexibilité et souplesse légendaires, en témoignent les 235 dérogations différentes que nous avons dû réunir pour pouvoir soutenir. Mention spéciale à Mme Coleou pour sa disponibilité et ses réponses toujours rapides à mes mails.

Merci à Pierre qui a contribué par ses travaux de master à mes travaux de thèse. Merci également Léa, Charlotte et Julia qui ont participé dans le cadre de leur projet de TP à la synthèse d'un polymère utilisé dans ces travaux. Merci aux élèves de 2^{ème} année de l'école pour m'avoir fourni des grammes et des grammes d'acide bromosuccinique.

Merci à Pascal, Catherine et Manu de l'INSERM pour m'avoir accueilli dans leur équipe et collaborer dans la bonne humeur et l'efficacité.

Merci à Chantal pour l'impression de cette thèse juste avant son départ en vacances.

Merci à toute ma famille, Papa, Maman, Brigitte, Zéhal, Louiza, Nour, Cécile, Alex, Sasha et Mamie. Familles Casajus, Artaso et Leroux. Vous êtes les responsables de ce que je suis devenu aujourd'hui, grâce à votre éducation, soutien et amour que vous m'avez transmis jour après jour. Et sachez que, malgré mon exil en Bretagne, je pense toujours autant à vous, je vous aime.

Merci tous les membres de l'ancienne équipe COS et de la nouvelle CORINT, présents et passés. Par ordre alphabétique, pour éviter les jalousies et les coups de klaxons : Ali, Allan, Amélie, Anaëlle, Antoine, Caroline, Cédric, Damien, Dim, Eva, Guillaume, Jean-Paul, Jeane,

Jelena, Josiane, Julien, Laurent, Loïc, Louise, Marie-Line, Mathieu, Nivishna, Prabhakar, Quentin, Sam, Sophie, Soriya, Thibault, Thomas, Vincent, Yann et Yari. Un grand merci à tous ! J'ai passé la plus grande partie de ces trois dernières années avec vous. Beaucoup de bons souvenirs et de franches rigolades. Merci de faire de notre lieu de travail un lieu accueillant et chaleureux qui donne envie de travailler (ou autre^^). Merci, aussi, de m'avoir supporté (en même temps vous aviez pas le choix non plus).

Merci aux Panthères de Rennes. Merci JF d'avoir créé ce grand club et de m'avoir fait découvrir ce sport. Merci à toutes les Panthères que j'ai côtoyé aux fils des saisons : Alex, Amaury, Anaëlle, Antoine, Caroline, Chris, Damien, David, Dim, Elodie, Eloi, Flo, Jérémie, Kim, Loïc, Malo, Marie Line, Patrick, Pipo, Quentin, Sam, Tugdual et Yari. Les matchs, les entraînements, les weekends, les tournois c'était toujours magique ! « Amis pour continuer la ronde je viens faire appel à toi... »

Merci à Quentin et à Thomas : mes partenaires de Beer-Pong et de palets respectifs. Merci pour nos nombreuses victoires « tûûût, tûûût !!!!»

Merci à tous mes amis éparpillés dans le monde entier. Merci Alexia, Alice, Almu, Big Costa, Bouich, Caro, Charli, Christelle, Chuchi, Ciri, Clavel, Clément, Coconne, Coquet, Daub, De...de...nis, Eleni, Erwan, Gros Yo, Ivan, JB, Jerem le poète, Jiminez, Juan Marcos, Juanma, Julie Fantfant, Kiri, Lise, Lucie, Lucile, Luismi, Marie Cagole, Marnay, Menchu, Mina, Mouthias, Paulette, Pepemou, Phare à On, Polvorin, Romain, Sam, Tito et Visage Pâle. Merci pour ces soirées mémorables, ces parties de belote endiablées, ces grandes discussions et raisonnements aupetit matin. C'est toujours un plaisir de vous revoir vous, votre mauvaise foi et votre bon foie. Je ne me plaindrais pas trop de vous puisqu'on a les amis qu'on mérite.

Merci enfin à Caroline, Sandrine et Sylvain mes encadrants de thèse, sans vous ce travail n'aurait jamais pu voir le jour. Trois encadrants pour un seul thésard ça peut paraître beaucoup, surtout au moment des corrections, mais la bonne entente qui s'était installée au fil des jours a perduré jusqu'à la fin. Merci de m'avoir formé et de m'avoir transmis vos connaissances au cours de ces trois années. Merci pour toutes les heures passées à lire et relire, à corriger et recorriger cette thèse. Pardon pour les petites mines du matin et le travail du soir durant cette dernière semaine de rédaction.

Liste des abréviations

Monomères et polymères

diMeMLABe	dimethylmalolactonate de benzyle
ϵ -CL	ϵ -caprolactone
MeOPEGOH	α -méthoxy- ω -hydroxyl poly(éthylène glycol)
MLABe	malolactonate de benzyle
PCL	poly(ϵ -caprolactone)
PEG	poly(éthylène glycol)
PHA	poly(hydroxyalcanoates)
PLA	poly(acide lactique)
PMLA	poly(acide malique)
PMLABe	poly(malate de benzyle)

Lipases

N435	Novozym 435 lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée
PPL	lipase de pancréas de porc
RML	lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>

Solvants, liquides ioniques et espèces chimiques

[bmim][PF6]	1-butyl-3-méthylimidazolium
[C12Mim][NTf2]	1-dodécyl-3-méthylimidazolium bis((trifluorométhyl)-sulfonyl)imide
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DiR	DiC18(7) (1,1''-dioctadécyl-3,3, 3'',3''-tétraméthylindotricarbocyanine iodure)
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
TEA	triéthylamine
TFA	acide trifluoroacétique
TFAA	anhydride trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
Tris	trishydroxyméthylaminométhane
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -nitrophénol
<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -nitrophényl butyrate

Méthodes d'analyses et valeurs caractéristiques

Đ	dispersité
D _h	diamètre hydrodynamique
DLS	diffusion dynamique de lumière
DSC	calorimétrie différentielle à balayage
FDA	Food and Drug Administration
HPLC	Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance
IC ₅₀	Concentration Inhibitrice médiane
IR	Infra-Rouge
\overline{M}_n	masse molaire moyenne en nombre
\overline{M}_w	masse molaire moyenne en masse
PDI	distribution en taille
¹ H RMN	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
¹³ C RMN	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
SEC	Chromatographie d'Exclusion Stérique
TEM	Microscopie Electronique en Transmission

Techniques de biologie moléculaire et gènes

ARNm	ARN messagers
<i>CYP2E1</i>	gène codant le cytochrome P450 2E1
<i>CYP3A4</i>	gène codant le cytochrome P450 3A4
<i>GSTA4</i>	gène codant la glutathione S-transférase A4
PCR	amplification en chaîne par polymérase
RT-PCR	PCR avec transcription inverse
<i>SOD2</i>	gène codant le Superoxide dismutase 2
qPCR	PCR quantitative
<i>UGT 1A1</i>	gène codant la UDP-glycosyltransférase 1 polypeptide A1
<i>UGT 1A6</i>	gène codant la UDP-glycosyltransférase 1 polypeptide A6
<i>UGT 1A9</i>	gène codant le glycosyltransférase 1 polypeptide A9
<i>xCT</i>	gène codant la protéine Cystine-Glutamate antiport

Autres

EC	Enzyme Commission
PDB	Protein Data Bank
REX	extrusion réactive
ROP	ring-opening polymerisation
S _N 2	substitution nucléophile d'ordre 2

Sommaire

Introduction Générale	23
Références bibliographiques	27
Introduction Bibliographique.....	31
I. Polymérisation par ouverture de cycle des lactones par des amorceurs et/ou des catalyseurs chimiques	33
II. Polymérisation par ouverture de cycle des lactones par des lipases.....	37
1. Les lipases	37
2. Polymérisation des lactones non-substituées	42
3. Polymérisation des lactones α/β méthylées.....	48
4. Polymérisation des lactones substituées.....	48
III. Conclusions	50
Références bibliographiques	51
Chapitre 1 : Optimisation des conditions expérimentales de la polymérisation enzymatique du malolactonate de benzyle	57
I. Les plans d'expérience	57
II. Construction, réalisation, analyse et extrapolation de notre plan d'expérience	60
1. Définitions des objectifs et contraintes de l'étude.....	60
2. Choix des réponses	60
3. Choix des paramètres	63
4. Détermination du modèle	64
5. Construction de la matrice expérimentale	65
6. Réalisation des essais	69
7. Détermination des coefficients et visualisations graphiques	71
8. Optimisation des paramètres	79
9. Validation du plan d'expérience	80
10. Extrapolation	81
11. Conclusions	83
III. Criblage des tampons.....	83

IV. Criblage des enzymes	86
Références bibliographiques	93
Experimental Part Chapter 1	95
I. General conditions.....	95
1. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy	95
2. Infrared spectroscopy	95
3. Size Exclusion Chromatography.....	95
4. Differential Scanning Calorimetry.....	95
II. Synthesis route of MLABe¹ (Figure 34).....	96
1. Synthesis of RS-bromosuccinic acid ¹	96
2. Synthesis of mixture of RS-3-benzyloxycarbonyl-3-bromopropanoic acid and RS-2-bromo-3-benzyloxycarbonylpropanoic acid ¹	97
3. Synthesis of RS-4-benzyloxycarbonyl-2-oxetanone ¹	98
III. Enzymatic polymerization	99
1. Enzymatic activity test	99
2. Enzymatic polymerization ²	99
IV. References.....	101
Chapitre 2 : Etudes mécanistiques et cinétiques de la polymérisation enzymatique du malolactonate de benzyle	105
I. Etude cinétique de la polymérisation enzymatique du MLABe (RS, R et S)	108
1. Cinétique de polymérisation avec les lactones RS, R et S.....	108
2. Détermination de l'ordre de la cinétique réactionnelle	112
3. Conclusions	116
II. Etude de la tacticité des PMLABe.....	116
1. Concepts théoriques.....	116
2. Analyses des différents PMLABe et résultats	120
3. Conclusions	122
III. Etudes mécanistiques	123
1. Polymérisation par ouverture de cycle des lactones non-substituées par des lipases	123
2. Mécanisme d'ouverture du MLABe par la lipase de pancréas de porc	125
3. La triade catalytique synthétique	127
4. Autres hypothèses possibles	133

5. Conclusions	135
IV. Conclusions	138
Références bibliographiques	141
Experimental Part Chapter 2	143
I. General conditions.....	143
1. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy	143
2. Infrared spectroscopy	143
3. Size Exclusion Chromatography.....	144
4. Differential Scanning Calorimetry.....	144
5. Polarimetry	144
6. Chiral High Performance Liquid Chromatography	144
II. Synthesis route of R-MLABe (Figure 58)¹.....	145
1. Synthesis of S-bromosuccinic acid	145
2. Synthesis of mixture of S-3-benzyloxycarbonyl-3-bromopropanoic acid and S-2-bromo-3-benzyloxycarbonylpropanoic acid ¹	145
3. Synthesis of R-4-benzyloxycarbonyl-2-oxetanone ¹	146
III. Synthesis route of S-MLABe (Figure 59) ¹	147
1. Synthesis of R-bromosuccinic acid.....	147
2. Synthesis of mixture of R-3-benzyloxycarbonyl-3-bromopropanoic acid and R-2-bromo-3-benzyloxycarbonylpropanoic acid ¹	147
3. Synthesis of S-4-benzyloxycarbonyl-2-oxetanone	148
IV. Polymerization.....	149
1. Enzymatic polymerization ²	149
2. Chemical polymerization	149
V. Experiments with MLABe oligomers	152
1. Synthesis of MLABe oligomers	152
2. Methanolysis of MLABe oligomers	153
VI. References.....	153
Chapitre 3 : Toxicité des nanoparticules à base des PMLABe chimiques ou enzymatiques : étude comparative	157

I. Présentation de l'étude comparative de la toxicité des nanoparticules à base de PMLABe chimiques et enzymatiques	160
1. Les polymères utilisés durant l'étude	160
2. Les types de tests biologiques réalisés	162
3. HepaRG un excellent modèle <i>in vitro</i> pour tester la toxicité hépatique	165
II. Résultats du test de captation des nanoparticules par les cellules HepaRG	168
1. Méthodologie de l'étude	168
2. Formulation des nanoparticules	168
3. Analyse des tests de captation et résultats	170
4. Conclusions	175
III. Résultats de l'étude de toxicité aiguë des nanoparticules sur les cellules HepaRG	175
1. Méthodologie de l'étude	175
2. Formulation des nanoparticules	175
3. Résultats des tests MTT	177
4. Conclusions	186
IV. Résultats de l'étude de toxicité chronique des nanoparticules sur les cellules HepaRG	187
1. Méthodologie de l'étude	187
2. Formulation des nanoparticules	188
3. Tests MTT et suivi de DO	189
4. Analyse des ARNm extraits lors de l'étude de toxicité chronique	193
5. Conclusions	196
V. Conclusions des tests biologiques	197
Références Bibliographiques	199
Experimental Part Chapter 3	203
I. General conditions	203
1. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy	203
2. Size Exclusion Chromatography	203
3. Dynamic Light Scattering	203
4. Flow cytometry	203
II. Polymer synthesis	204
1. Chemical synthesis of PMLABe ¹	204
2. Enzymatic polymerization of PMLABe ²	204
3. Enzymatic synthesis of PEG ₇₃₆ - <i>b</i> -PMLABe	204

III. Polymer formulation by nano-precipitation	205
1. Formulation for the uptake assays	205
2. Formulation for the acute toxicity	205
3. Formulation for the chronic toxicity	206
IV. Biological assays	206
1. HepaRG culture	206
2. Formulation uptake assays	206
3. Acute toxicity studies	207
4. Chronic toxicity studies	207
V. References.....	208
Conclusion Générale.....	213
Abstract.....	217
Résumé.....	218

Table des figures

<i>Figure 1 : Avantages et inconvénients des différentes voies de polymérisation</i>	<i>25</i>
<i>Figure 2 : Polymérisation par ouverture de cycle du MLABe en présence de benzoate de tétraéthylammonium ¹⁸</i>	<i>25</i>
<i>Figure 3: Polymérisation anionique par ouverture de cycle de l'ε-caprolactone ²⁰</i>	<i>33</i>
<i>Figure 4 : Polymérisation d'insertion-coordination par ouverture de cycle de l'ε-caprolactone ²²</i>	<i>34</i>
<i>Figure 5 : Polymérisation anionique par ouverture de cycle d'une β-lactone-β-substituée</i>	<i>35</i>
<i>Figure 6 : Mécanisme de la polymérisation par monomère activé proposé par Ren et al. pour la polymérisation de l'ε-caprolactone en présence d'acide borique ³³</i>	<i>37</i>
<i>Figure 7 : Réactions catalysées par les lipases ³⁵</i>	<i>38</i>
<i>Figure 8 : Structure de la lipase Lip2 de Y. lipolytica obtenue par homologie de structure avec des lipases fongiques aux structures tridimensionnelles connues ³⁷</i>	<i>39</i>
<i>Figure 9 : Mécanisme canonique de l'hydrolyse d'un ester ⁴⁰</i>	<i>41</i>
<i>Figure 10 : Mécanisme admis de la polymérisation enzymatique par ouverture de cycle des lactones ⁴⁴</i>	<i>42</i>
<i>Figure 11 : Représentation des nanoréacteurs utilisés pour la polymérisation de lactone en milieu aqueux ⁴⁷</i>	<i>45</i>
<i>Figure 12 : Lactones chirales α/β méthylées.....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 13 : Monomère et amorceur décrit dans les travaux de Panova et al. ⁷⁴</i>	<i>49</i>
<i>Figure 14 : Malolactonates d'alkyle</i>	<i>49</i>
<i>Figure 15 : Les différentes étapes d'un plan d'expérience</i>	<i>59</i>

Figure 16 : Spectre RMN 1H (acétone-d6) permettant la détermination du taux de conversion et du taux d'hydrolyse ...	62
Figure 17 : Diagramme des effets des différents facteurs et intervalle de confiance (95%) sur Y1 après analyse globale	72
Figure 18 : Diagramme des effets des différents facteurs et intervalle de confiance (95%) sur Y1 après réduction des variables non significatives	73
Figure 19 : Diagramme des effets des différents facteurs et intervalles de confiance (95%) pour Y2, Y3 et Y4	74
Figure 20 : Diagramme des effets principaux moyens pour Y1.....	75
Figure 21 : Surface de réponse du taux de conversion en fonction de la température et de la concentration du tampon avec un ratio enzyme/lactone de 1/40, un ratio tampon/toluène de 1/2 et une concentration en lactone de 1,47 mol/L	76
Figure 22 : Surface de réponse du taux d'hydrolyse en fonction de la température et de la vitesse d'agitation avec un ratio tampon/toluène de 1/2 et une concentration en lactone de 2,45 mol/L	77
Figure 23 : Surface de réponse de la masse molaire moyenne en masse en fonction de la concentration en lactone et du ratio tampon/toluène avec un ratio enzyme/lactone de 1/40, une vitesse d'agitation de 390 rpm, une température de 60°C et une concentration en tampon de 105 mM.....	78
Figure 24 : Surface de réponse de la dispersité en fonction de la concentration en lactone et du ratio enzyme/lactone avec une température de 60°C	79
Figure 25 : Comparaison des valeurs théoriques et expérimentales.....	81
Figure 26 : Comparaison des taux de conversion et des taux d'hydrolyse en fonction du tampon	84
Figure 27 : Comparaison des masses molaires moyenne en masse et de la dispersité des polymères obtenus en fonction du tampon	85
Figure 28 : Présentation des enzymes criblées.....	86
Figure 29 : Activités enzymatiques des différentes lipases sur le p-NPB.....	87
Figure 30 : Comparaison des taux de conversion et des taux d'hydrolyse en fonction de l'enzyme	88
Figure 31 : Comparaison des masses molaires moyenne en masse des polymères obtenus en fonction de l'enzyme	89
Figure 32 : Comparaison des dispersité des polymères obtenus en fonction de l'enzyme.....	89
Figure 33 : Lipases criblées aux résultats les plus intéressants	90
Figure 34 : Synthesis route of MLABe	96
Figure 35 : 1 ^{er} et 2 ^{ème} scan du polymère synthétisé par voie chimique à partir du MLABe racémique.....	106
Figure 36 : 1 ^{er} et 2 ^{ème} scan du polymère synthétisé par voie enzymatique à partir du MLABe racémique.....	106
Figure 37 : Structure hypothétique du polymère obtenu par voie enzymatique à partir du MLABe racémique	107
Figure 38 : Evolution du taux de conversion au cours du temps en fonction de la chiralité du monomère	109
Figure 39 : Evolution du taux d'hydrolyse au cours du temps en fonction de la chiralité du monomère.....	110
Figure 40 : Evolution de la masse molaire moyenne en masse des PMLABe au cours du temps en fonction de la chiralité du monomère.....	110
Figure 41 : Evolution de la dispersité des PMLABe au cours du temps en fonction de la chiralité du monomère	111
Figure 42 : Evolution du pouvoir rotatoire des PMLABe au cours du temps et en fonction de la chiralité du monomère	112
Figure 43 : Evolution du logarithme $\ln(n_0/n_t)$ au cours du temps en fonction de la chiralité des monomères	114

Figure 44 : Structure hypothétique du polymère obtenu par voie enzymatique à partir du RS-MLABe	116
Figure 45 : Représentation schématique d'un polymère atactique	117
Figure 46 : Représentation schématique d'un polymère isotactique.....	117
Figure 47 : Représentation schématique d'un polymère syndiotactique.....	117
Figure 48 : Les deux types de diades possibles	117
Figure 49 : Les quatre types de triades possibles.....	118
Figure 50 : Spectre RMN ¹³ C du PMLABe dans CDCl ₃	119
Figure 51 : Zoom du spectre RMN ¹³ C de la zone correspondant au carbone asymétrique.....	119
Figure 52 : Zoom de la zone entre 68 et 69 ppm des spectres ¹³ C des polymères étudiés.....	120
Figure 53 : Mécanisme de l'ouverture de l'ε-caprolactone par une lipase ¹⁰	123
Figure 54 : Réactions possibles lors de la polymérisation enzymatique de l'ε-caprolactone ⁶	124
Figure 55 : Les deux types d'ouvertures possibles pour le MLABe	125
Figure 56 : La triade catalytique d'une lipase et son mime de synthèse ¹³	127
Figure 57 : Première étape hypothétique de l'ouverture de la lactone.....	131
Figure 58 : Superposition des spectres RMN de la diMeMLABe (A) avant et (B) après polymérisation.....	132
Figure 59 : Structure du β-malate de benzyle	133
Figure 60 : Structure du malate de diméthyle.....	135
Figure 61 : Les différents mécanismes envisagés.....	137
Figure 58 : Synthesis route of R-MLABe	145
Figure 59 : Synthesis route of S-MLABe	147
Figure 64 : Représentation schématique des différents nanovecteurs ¹²⁻¹⁶	158
Figure 65 : Structure du PMLA avec la fonction acide carboxylique latérale en orange.....	159
Figure 66 : Structure de la sonde fluorescente DiR	163
Figure 67 : Résumé des tests biologiques réalisés	165
Figure 68 : Cliché de cellules HepaRG progénitrices	166
Figure 69 : Cliché de cellules HepaRG différenciées.....	167
Figure 70 : Cycle cellulaire des cellules HepaRG	168
Figure 71 : Courbe d'étalonnage donnant la concentration en DiR dans un mélange DMF/eau (80/20) en fonction de la DO.....	169
Figure 72 : Détermination de la fenêtre de mesure de la fluorescence du cytomètre en fonction de la taille et de la granulométrie.....	171
Figure 73 : Histogramme de la mesure de fluorescence pour les cellules contrôles	171
Figure 74 : Histogrammes des mesures de fluorescence des cellules traitées par les différentes formulations.....	172
Figure 75 : Pourcentage de cellules positives en fonction du type de nanoparticules.....	173
Figure 76 : Intensité de la fluorescence mesurée sur les cellules en fonction du type de nanoparticules.....	173
Figure 77 : Taux de survie des cellules en fonction des formulations et de leur concentration	178

Figure 78 : Extrait de la Figure 77 illustrant l'effet de la masse molaire des polymères sur la toxicité des nanoparticules correspondantes	179
Figure 79 : Extrait de la Figure 77 illustrant l'effet de la voie de synthèse du polymère sur la toxicité des nanoparticules correspondantes	180
Figure 80 : Extrait de la Figure 77 illustrant l'effet de la chiralité du MLABe sur la toxicité des nanoparticules correspondantes	181
Figure 81 : Extrait de la Figure 77 illustrant la toxicité de NP2	182
Figure 82 : Extrait de la Figure 77 illustrant l'effet du PEG sur la toxicité des nanoparticules correspondantes	183
Figure 83 : Détermination des IC_{50} pour deux formulations, NP2 et NP5.	184
Figure 84 : Clichés des cellules HepaRG lors de l'étude de toxicité aiguë	185
Figure 85 : Calendrier des expositions et des tests réalisés lors des tests de toxicité chronique	187
Figure 86 : Taux de survie des cellules en fonction du type de nanoparticules lors de l'étude de toxicité chronique	189
Figure 87 : Suivi de l'activité MTT au cours de l'étude de toxicité chronique.....	190
Figure 88 : Clichés des cellules HepaRG au cours de l'étude de toxicité chronique.....	192
Figure 89 : Histogrammes présentant le niveau d'expression des ARNm pour les différents gènes étudiés en fonction du cycle cellulaire et du type de nanoparticules	194
Figure 90 : Principaux résultats de l'activité des nanoparticules sur les cellules HepaRG	198
Figure 91 : Planning of the chronic toxicity studies.....	208

Table des tableaux

Tableau 1 : Applications des polyesters dans les domaines biomédical et pharmaceutique	23
Tableau 2 : Masses molaires et dispersité des PCL synthétisés par voie enzymatique par différentes lipases.....	43
Tableau 3 : Récapitulatif de certaines des techniques de polymérisations enzymatiques.....	47
Tableau 4 : Comparaison des différentes polymérisations par ouverture de cycle.....	50
Tableau 5 : Réponses choisies pour le plan d'expérience.....	63
Tableau 6 : Paramètres étudiés	64
Tableau 7 : Matrice de covariance du plan complet	66
Tableau 8 : Types de plans d'expériences pouvant être utilisés.....	67
Tableau 9 : Matrice d'état du plan optimisé.....	68
Tableau 10 : Matrice de covariance du plan optimisé	68
Tableau 11 : Matrice des conditions opératoires.....	69
Tableau 12 : Résultats du plan d'expérience.....	70
Tableau 13 : Valeurs optimisées des différents paramètres	80
Tableau 14: Résultats des essais avec les paramètres optimisés	80
Tableau 15 : Comparaison des valeurs prédites par le plan et celle obtenues expérimentalement	81

Tableau 16 : Résultats des polymérisations en l'absence de solvant organique	82
Tableau 17 : Masses molaires et dispersité des polymères après précipitation	83
Tableau 18 : Résultats de l'étude sur l'influence de la nature du tampon	84
Tableau 19 : Résultats des analyses DSC des polymères issus du criblage	91
Tableau 20 : Résultats des analyses calorimétriques de différents polymères en fonction de la voie de synthèse	106
Tableau 21 : Résultats de la cinétique de polymérisation des différents énantiomères du MLABe	109
Tableau 22 : Résultats des calculs du nombre de moles de monomère au cours du temps	114
Tableau 23 : Résultats de l'étude de tacticité	122
Tableau 24 : Résultats des mesures de pouvoirs rotatoires des polymères synthétisés	126
Tableau 25: Résultats de la polymérisation du L-lactide par le mime de la triade catalytique ¹³	128
Tableau 26 : Résultats de la polymérisation du MLABe en utilisant le mime de la triade catalytique	129
Tableau 27 : Résultats de la synthèse d'oligomères	134
Tableau 28 : Caractéristiques physico-chimiques des polymères testés.	162
Tableau 29 : Caractéristiques des nanoparticules encapsulant le DiR utilisées lors de l'étude de captation	169
Tableau 30: Concentrations massiques des différentes formulations lors du test de captation	174
Tableau 31 : Caractéristiques des nanoparticules utilisées lors de l'étude de toxicité aigüe.....	176
Tableau 32 : Valeurs des IC ₅₀ pour les NP 2 et les NP 5.....	184
Tableau 33 : Caractéristiques des nanoparticules utilisées lors de l'étude de toxicité chronique.....	188
Tableau 34 : Gènes étudiés dans l'étude de toxicité chronique et leur rôle	193
Tableau 35 : Mesure de l'expression des ARNm pour les cellules proliférantes.....	195
Tableau 36 : Mesure de l'expression des ARNm pour les cellules confluentes.....	195
Tableau 37 : Mesure de l'expression des ARNm pour les cellules différenciées.....	195

Table des équations

Équation 1 : Modèle mathématique théorique.....	65
Équation 2 : Equations des différentes réponses	72
Équation 3 : Vitesse de réaction pour une réaction d'ordre 1.....	113
Équation 4 : Linéarisation de l'équation de vitesse pour une réaction d'ordre 1	113
Équation 5 : Calcul du nombre de moles à l'instant t en fonction du taux de conversion.....	113

Table des schémas

<i>Schéma 1 : Schéma réactionnel du passage réversible de la forme active à la forme dormante de l'amorceur</i> ²⁷	36
<i>Schéma 2 : Réaction d'hydrolyse enzymatique du p-NPB en p-NP</i>	87
<i>Schéma 3 : Mécanisme supposé de la polymérisation par ouverture de cycle de la β-propiolactone</i> ¹⁶	130
<i>Schéma 4 : Schéma réactionnel du test MTT</i> ⁴⁰	163

Introduction Générale

Introduction Générale

Les polyesters aliphatiques sont une famille de polymères aux propriétés de (bio)compatibilité et de (bio)dégradabilité remarquables, particulièrement appréciées lorsque ces polymères sont préparés pour des applications en relation avec le monde du vivant (domaines environnemental et biomédical). Le marché des polyesters aliphatiques biodégradables est en forte croissance sur les dernières années. En 2005, le marché global de ces polymères était de 94 800 tonnes et il atteignait, en 2010, les 214 400 tonnes soit un taux de croissance annuelle composée de 18 %¹. Le poly(acide lactique) PLA représentait, à lui seul, 17 % du volume global des polymères biodégradables en 2005¹. Il est surtout utilisé pour remplacer les polymères issus de la pétrochimie, notamment pour la production d'emballages². Cette situation devrait se poursuivre car, d'après un rapport de Markets and Markets, l'acide lactique et le PLA représenteraient l'un des marchés majeurs de l'industrie chimique d'ici 2020. Le marché du PLA atteindrait plus de 5 milliards de dollars en 2020 avec un taux de croissance composé de 21 %³.

Ces polymères étant en contact direct avec le corps humain, ils respectent un cahier des charges très strict. Ils doivent être, entre autre, non-toxiques, non-immunogéniques, non-carcinogéniques et de non-trombogéniques⁴. De plus, ils doivent être biodégradés en molécules de plus petites masses molaires qui respectent ces mêmes critères, ou éliminés de l'organisme. Le Tableau 1 présente certaines des applications de ces polymères (bio)dégradables.

Tableau 1 : Applications des polyesters dans les domaines biomédical et pharmaceutique

Domaines biomédical et pharmaceutique ⁴		Références
Chirurgie	Fibre de polyester pour de la chirurgie reconstructive	5
Fil de suture	Fil de suture commercialisé Ti-Cron™	6
Ingénierie tissulaire	Feuillet de polymères pour la reconstruction des tissus	7
Dispositif d'ostéosynthèse	Implants pour la reconstruction ligamentaire ou spinale	8,9
Pansements	Pansements en poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate)	10
Vecteurs de principes actifs	Nanoparticules encapsulant des molécules d'intérêt	11

Généralement, ces polyesters sont synthétisés par polymérisation chimique, soit par polycondensation d'un diacide avec un dialcool par exemple, soit par polymérisation par ouverture de cycle (ring-opening polymerisation, ROP) à partir de lactones ou du lactide¹². La polymérisation par ouverture de cycle permet d'obtenir des polymères ayant des masses

molaires élevées et des structures maîtrisées¹³. Par contre, elle fait intervenir des amorceurs cationiques, anioniques ou organométalliques, pouvant être retrouvés, sous forme de traces, dans les matériaux finaux induisant donc une toxicité liée à la présence de ces amorceurs toxiques¹⁴.

Par conséquent, des voies de synthèses se développent en parallèle afin de pallier à cet inconvénient majeur, notamment dans le cadre d'applications en santé humaine. L'utilisation de catalyseurs biologiques, comme les lipases, présente un intérêt grandissant. En effet, les enzymes permettent des polymérisations dans des conditions plus douces (températures, pression, pH), évitent l'utilisation de solvants et, surtout, ne sont pas toxiques¹⁵. Les premières publications traitant de la polymérisation par ouverture de cycle d'une lactone catalysée par une enzyme datent de 1993. Elles sont le fruit du travail de deux équipes différentes :

- S. Kobayashi *et al.*¹⁶ ont synthétisé un poly(ϵ -caprolactone), PCL, en utilisant la lipase de *Pseudomonas fluorescens*.
- D. Kohn *et al.*¹⁷ ont également synthétisé un PCL en utilisant la lipase du pancréas de porc (PPL).

Même si les conditions opératoires (temps de réaction très long de 10 à 26 jours) et les résultats étaient encore perfectibles, ces publications ont prouvé la possibilité de synthèse des polyesters par voie enzymatique et ont permis l'émergence de nouveaux travaux dans cette direction.

Cependant, cette voie de synthèse présente encore de nombreuses barrières qui doivent être surmontées pour qu'elle soit appliquée industriellement. Le principal verrou, à ce jour, est la faible masse molaire des polymères obtenus (Figure 1). Avant de songer à de futures utilisations, il est primordial d'arriver à synthétiser des polymères ayant un nombre d'unités de répétition suffisant pour pouvoir être mis en forme. En effet, les propriétés physico-chimiques des polymères dépendent, entre autre, de ce nombre d'unités de répétition. Par exemple, la température de transition vitreuse (T_g) d'un polymère augmente lorsque son nombre d'unité de répétition augmente, jusqu'à une certaine limite. Par ailleurs, pour qu'un polymère hydrophobe ou un copolymère amphiphile puisse être formulé sous forme de

nanoparticules, il doit posséder un nombre d'unités de répétition suffisamment élevé, ce nombre dépendant du type de monomère (chiralité, hydrophobicité, fonctions chimiques).

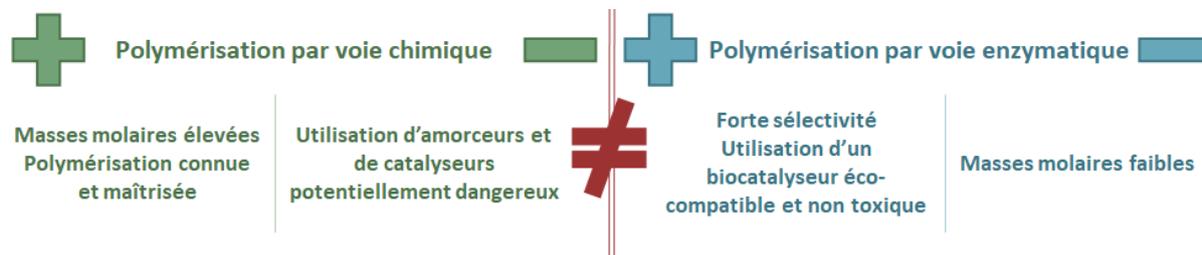


Figure 1 : Avantages et inconvénients des différentes voies de polymérisation

Dans ce contexte, nous nous sommes concentrés sur la synthèse, par polymérisation enzymatique en présence de lipases, de polyesters ayant une masse molaire suffisante pour avoir des propriétés physico-chimiques intéressantes pour des applications sous forme de nanoparticules pour la vectorisation de principes actifs.

Les travaux de cette thèse porte, plus spécifiquement, sur le poly(malate de benzyle) (PMLABe), un polyester obtenu à partir d'une β -lactone- β -substituée, le malolactonate de benzyle (MLABe). La voie de synthèse chimique du monomère, le MLABe, a été optimisée en 1996, par S. Cammas *et al.*¹⁸ (Figure 2). Le PMLABe est obtenu par polymérisation anionique par ouverture de cycle du MLABe en présence de benzoate de tétraéthylammonium, une violente neurotoxine¹⁹.

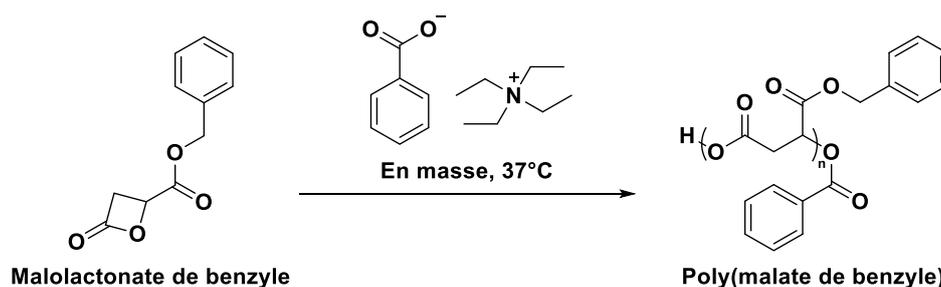


Figure 2 : Polymérisation par ouverture de cycle du MLABe en présence de benzoate de tétraéthylammonium¹⁸

Nous nous sommes donc fixés comme objectifs : (i). la synthèse enzymatique de PMLABe ayant un degré de polymérisation supérieur à 50 afin de pouvoir être mis en forme, (ii). la compréhension du mécanisme réactionnel faisant intervenir la lipase, (iii). la réalisation de tests de cytotoxicité sur des nanoparticules préparées à partir de polymères synthétisés soit

par voie chimique, soit par voie enzymatique puisque les applications potentielles se situent dans le domaine biomédical.

Pour atteindre ces objectifs, la stratégie définie est la suivante : *(i)*. l'optimisation des conditions expérimentales de la polymérisation, catalysée par une lipase sélectionnée, grâce à l'élaboration d'un plan d'expérience ²⁰, *(ii)*. le criblage de différentes lipases dans les conditions expérimentales déterminées précédemment, *(iii)*. des études mécanistiques et cinétiques pour comprendre et appréhender le mécanisme réactionnel, *(iv)*. une étude comparative des cytotoxicités de nanoparticules obtenues à partir de polymères synthétisés soit par voie chimique soit par voie enzymatique.

Références bibliographiques

- (1) Fakirov, S. *Biodegradable Polyesters*; John Wiley & Sons, 2015.
- (2) Rydz, J.; Sikorska, W.; Kyulavska, M.; Christova, D. Polyester-Based (Bio)Degradable Polymers as Environmentally Friendly Materials for Sustainable Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *16* (1), 564–596 DOI: 10.3390/ijms16010564.
- (3) Lactic Acid Market worth 3.82 Billion USD & Polylactic Acid Market worth 5.16 Billion USD by 2020 <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/polylacticacid.asp> (accessed Oct 25, 2017).
- (4) Vert, M. Aliphatic Polyesters: Great Degradable Polymers That Cannot Do Everything. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (2), 538–546 DOI: 10.1021/bm0494702.
- (5) Itskovitz-Eldor, J.; Zussman, E.; Lowenstein, L.; Zeevi-Levin, N.; Eldor, L. Devices for Surgical Applications. EP2550982 (A1), January 30, 2013.
- (6) Store-Factory. TI-CRON Suture monofil synthétique non résorbable <http://www.santelia.fr/ti-cron.htm> (accessed May 23, 2017).
- (7) Focarete, M. L.; Gualandi, C.; Scandola, M.; Govoni, M.; Giordano, E.; Foroni, L.; Valente, S.; Pasquinelli, G.; Gao, W.; Gross, R. A. Electrospun Scaffolds of a Polyhydroxyalkanoate Consisting of ω -Hydroxypentadecanoate Repeat Units: Fabrication and In Vitro Biocompatibility Studies. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2010**, *21* (10), 1283–1296 DOI: 10.1163/092050609X12517190417597.
- (8) Prządka, P.; Kiełbowicz, Z.; Osiński, B.; Dzimira, S.; Madej, J. A.; Nowacki, W.; Kubiak, K.; Reichert, P.; Cegielski, M. Reconstruction of Cranial Cruciate Ligament in Rabbits Using Polyester Implants Saturated with PRP, Antlerogenic Stem Cells MIC-1 and Their Homogenate. *Connect. Tissue Res.* **2016**, *58* (5), 1–15 DOI: 10.1080/03008207.2016.1251911.
- (9) Paddock, B. W.; Sharifi-Mehr, A. A.; Wollowick, A. L.; Buchert, O.; Havener, M. B.; Cipoletti, R.; Willis, S.; Long, M. G. Partially Resorbable Implants and Methods. EP3095417 (A1), November 23, 2016.
- (10) Andrew, W.; Dr, J. R. A. Wound Dressings. GB2166354 (A), May 8, 1986.
- (11) Loyer, P.; Cammas-Marion, S. Natural and Synthetic Poly(Malic Acid)-Based Derivates: A Family of Versatile Biopolymers for the Design of Drug Nanocarriers. *J. Drug Target.* **2014**, *22* (7), 556–575 DOI: 10.3109/1061186X.2014.936871.
- (12) Allcock, H. R.; Lampe, F. W. Chap. 6 Polymerization of Cyclic Organic Compounds. In *Contemporary Polymer Chemistry 2nd Edition*; 1990; pp 122–123.
- (13) Jérôme, C.; Lecomte, P. Recent Advances in the Synthesis of Aliphatic Polyesters by Ring-Opening Polymerization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (9), 1056–1076 DOI: 10.1016/j.addr.2008.02.008.
- (14) Tanzi, M. C.; Verderio, P.; Lampugnani, M. G.; Resnati, M.; Dejana, E.; Sturani, E. Cytotoxicity of Some Catalysts Commonly Used in the Synthesis of Copolymers for Biomedical Use. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1994**, *5* (6–7), 393–396 DOI: 10.1007/BF00058971.
- (15) Shoda, S.; Uyama, H.; Kadokawa, J.; Kimura, S.; Kobayashi, S. Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (4), 2307–2413 DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00472.
- (16) Uyama, H.; Takeya, K.; Kobayashi, S. Synthesis of Polyesters by Enzymatic Ring-Opening Copolymerization Using Lipase Catalyst. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **1993**, *69* (8), 203–207 DOI: 10.2183/pjab.69.203.
- (17) Knani, D.; Gutman, A. L.; Kohn, D. H. Enzymatic Polyesterification in Organic Media. Enzyme-Catalyzed Synthesis of Linear Polyesters. I. Condensation Polymerization of Linear Hydroxyesters. II. Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **1993**, *31* (5), 1221–1232 DOI: 10.1002/pola.1993.080310518.
- (18) Cammas, S.; Renard, I.; Langlois, V.; Guerin, P. Poly(β -Malic Acid): Obtaining High Molecular Weights by Improvement of the Synthesis Route. *Polymer* **1996**, *37* (18), 4215–4220 DOI: 10.1016/0032-3861(96)00204-2.
- (19) Tetraethylammonium. DrugBank; DrugBank, Ed.
- (20) Casajus, H.; Tranchimand, S.; Wolbert, D.; Nugier-Chauvin, C.; Cammas-Marion, S. Optimization of Lipase-Catalyzed Polymerization of Benzyl Malolactonate through a Design of Experiment Approach. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134* (11) DOI: 10.1002/app.44604.

Introduction

Bibliographique

Introduction Bibliographique

Dans notre société actuelle, les polymères jouent un rôle essentiel et sont omniprésents. Grâce à leurs propriétés ajustables en fonction de l'utilisation souhaitée et à leurs faibles coûts de revient, la production de polymères est en croissance continue ¹. En effet, dans les années 60, la production annuelle de polymère était de 15 millions de tonnes ; en 2014, elle dépassait 310 millions de tonnes, et ce chiffre devrait tripler d'ici 2050 ². Malgré la place importante que les macromolécules occupent à l'heure actuelle, le domaine des polymères est une science récente. Au début du 20^{ème} siècle, la notion même de macromolécules était très controversée parmi les chimistes. En effet, la plupart des scientifiques de cette époque reniaient l'existence de molécules pouvant avoir des masses molaires supérieures à 5 000 g/mol. La mise au point de nouvelles méthodes d'analyses, telles que les rayons-X ou la viscosimétrie, a permis à Hermann Staudinger, pionnier dans les polymères et prix Nobel de chimie en 1953, d'imposer sa vision et de prouver de manière irréfutable l'existence des polymères ³.

Les années 40 et 50 marquent le véritable essor des polymères. D'une part, les avancées scientifiques se succèdent sur la compréhension et la maîtrise de la polymérisation et, d'autre part, la nécessité de remplacer les matériaux naturels, comme l'acier en pénurie durant de la seconde guerre mondiale, ouvre les portes aux matériaux polymères ⁴. Les progrès réalisés depuis cette époque sont très importants, notamment en ce qui concerne les techniques de polymérisation et de caractérisation des macromolécules. A l'heure actuelle, les polymères peuvent être synthétisés à façon, et leurs propriétés sont ajustables en fonction des techniques de polymérisation utilisées et des monomères sélectionnés ⁵.

Les polymères trouvent des applications dans tous les domaines de notre quotidien, tels que l'automobile et l'aéronautique où la légèreté et la résistance de ces matériaux sont fortement appréciées, l'emballage où les propriétés barrières des polymères sont utilisées, la santé où la dégradabilité de certains polymères ou, au contraire, leur excellente résistance en font des matériaux de choix pour ce domaine.

Parmi les très nombreux matériaux polymères synthétisés, les polyesters aliphatiques, présentant des propriétés de (bio)dégradabilité et de (bio)compatibilité remarquables, sont

utilisés, non seulement dans les domaines biomédicaux et pharmacologiques, mais également dans l'industrie des sacs plastiques en remplacement du poly(éthylène), polymère non (bio)dégradable issus directement de la pétrochimie ⁶. Les polyesters aliphatiques peuvent être synthétisés, d'une part, par polymérisation chimique du ou des monomère(s) correspondant(s) ⁷. D'autre part, certains de ces polyesters peuvent être préparés par voies biotechnologiques, à savoir soit préparés par des bactéries placées en condition de stress, comme c'est le cas des poly(hydroxy alcanates) ou PHAs ⁸, soit extraits de champignons, comme c'est le cas pour le poly(acide malique) naturel extrait de *Physarum polycephalum* ⁹. L'intérêt de ces voies biotechnologiques réside principalement dans l'utilisation de procédés de synthèse dits « verts ». Cependant, il est difficile, voire impossible, de contrôler les masses molaires des polymères ainsi que leur chiralité. Par conséquent, les méthodes de synthèse dites « chimiques » ne peuvent pas être, à l'heure actuelle, totalement écartées. Cependant, il faut prendre en compte que les amorceurs et/ou catalyseurs utilisés lors de ces réactions de polymérisation peuvent être à l'origine de toxicités non souhaitées lorsque les polymères correspondant sont en contact avec le monde du vivant, même si amorceurs/catalyseurs ne sont présents qu'à l'état de traces dans le matériau final ¹⁰.

Parmi les polyesters aliphatiques utilisés dans le domaine biomédical, le poly(acide malique), ou PMLA, et ses dérivés sont des candidats de choix en raison de leurs propriétés de (bio)compatibilité et de (bio)dégradabilité ^{11,12}.

A côté de ces propriétés remarquables, toute une famille de dérivés du PMLA est accessible grâce à la maîtrise, d'une part, de la synthèse des monomères et, d'autre part, de l'homo- et copolymérisation de ces monomères ^{13,14}. Cette famille de polyesters est obtenue par polymérisation anionique par ouverture de cycle des monomères, les malolactonates d'alkyle, en présence de benzoate de tétraéthylammonium, notamment ¹⁵. Il est important de noter que le benzoate de tétraéthylammonium utilisé comme amorceur est une violente neurotoxine ^{15,16}.

Par conséquent, l'utilisation de biocatalyseurs, comme les lipases, est une alternative intéressante pour éviter la présence de traces d'amorceurs chimiques dans les matériaux polymères. En effet, ces protéines, responsables du métabolisme cellulaire, ne devraient pas

présenter de toxicité particulière vis-à-vis du monde du vivant, d'autant plus qu'elles seront, comme tout catalyseur, totalement éliminées du produit fini ou seulement présentes à l'état de traces. Cependant, certains verrous technologiques restent encore à lever pour remplacer complètement les amorceurs/catalyseurs chimiques. En effet, les polymérisations enzymatiques sont, à ce jour, moins maîtrisées que les polymérisations chimiques¹⁷⁻¹⁹.

Cette introduction bibliographique a pour objectif de présenter les méthodes actuelles de polymérisation par ouverture de cycle des lactones, pour la synthèse de polyesters aliphatiques, avec un intérêt particulier sur l'utilisation des lipases pour catalyser ce type de polymérisation.

I. Polymérisation par ouverture de cycle des lactones par des amorceurs et/ou des catalyseurs chimiques

Les mécanismes de polymérisation par ouverture de cycle sont directement liés aux types d'amorceurs utilisés ainsi qu'à la nature du monomère cyclique sélectionné (lactone non-substituée ou substituée). Deux types de polymérisation sont principalement décrits pour des lactones non substituées, telles que l' ϵ -caprolactone (ϵ -CL), et pour le lactide : la polymérisation anionique et la polymérisation par coordination-insertion²⁰.

La polymérisation anionique par ouverture de cycle de lactone non substituée ou du lactide est amorcée par attaque du nucléophile sur le carbonyle du cycle conduisant à une ouverture du cycle dite en *O*-acyle. L'alcoolate ainsi formé va à son tour réagir avec un monomère cyclique lors de l'étape de propagation pour conduire à la formation du polyester correspondant (Figure 3).

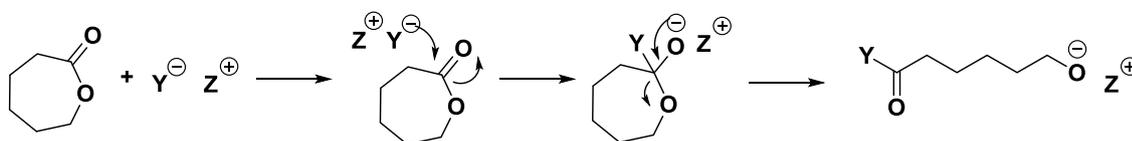


Figure 3: Polymérisation anionique par ouverture de cycle de l' ϵ -caprolactone²⁰

Les fins de chaînes des polymères sont déterminées par le type d'amorceur utilisé et les masses molaires des polymères sont fixés par le ratio initial monomère/amorceur. Il est donc possible de contrôler la structure finale du polymère. Toutefois, des réactions secondaires apparaissent, limitent les masses molaires des polymères synthétisés et provoquent un écart

entre la valeur théorique fixée par le ratio monomère/amorceur et les valeurs mesurées. En effet, les réactions secondaires peuvent avoir lieu soit entre le monomère/polymère en croissance et le solvant (transfert au solvant), soit entre le monomère/polymère en croissance et un autre monomère /polymère en croissance (transfert intermoléculaire), soit entre le polymère en croissance et lui-même (transfert intramoléculaire) conduisant, dans ce cas, à la formation de polymère cyclique.²¹

La polymérisation par coordination-insertion de lactones non substituée (ϵ -CL, par exemple) a lieu en présence d'un amorceur de type alcoolate métallique. La première étape consiste en la coordination entre le métal et l'oxygène de la fonction carbonyle du monomère. Ensuite, l'insertion du monomère dans la liaison métal-alcoolate a lieu par une attaque nucléophile. Le cycle de lactone s'ouvre par un mécanisme *O*-acyle formant ainsi l'espèce responsable de la propagation (Figure 4)²².

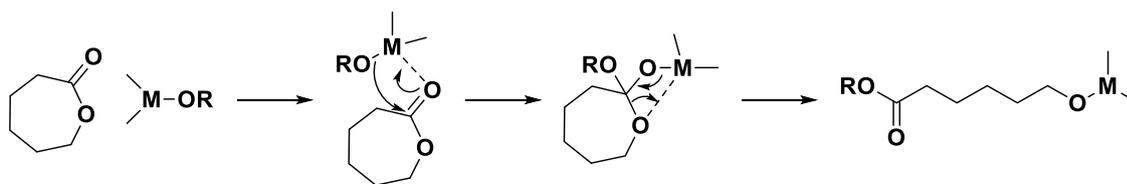


Figure 4 : Polymérisation d'insertion-coordination par ouverture de cycle de l' ϵ -caprolactone²²

Ces amorceurs sont parfois moins réactifs que les amorceurs anioniques mais ils ont l'avantage de ne pas engendrer de réactions secondaires. Ils permettent donc un meilleur contrôle de la polymérisation²³. De plus, comme aucune réaction de terminaison n'a lieu, les espèces responsables de la propagation sont toujours actives. Cette propriété des polymérisations dite « vivantes » permet la synthèse de copolymères à blocs. En effet, une fois le premier monomère consommé, il suffit de rajouter, dans le milieu, le co-monomère pour que la réaction redémarre et qu'un copolymère soit formé.

Parallèlement, les β -lactones β -substituées, permettant d'obtenir entre autre le PMLABe, sont aussi polymérisées par polymérisation anionique par ouverture de cycle en présence d'amorceurs chimiques, mais selon un mécanisme différent de celui brièvement décrit plus haut. En effet, ces lactones sont polymérisées en présence d'un carboxylate dont le contre-ion est soit le tétraéthylammonium¹⁵, soit le potassium crypté par de l'éther couronne¹⁴. L'amorçage de la polymérisation a lieu par une attaque de type S_N2 du carboxylate sur le

carbone situé en position beta du carbonyle, conduisant à une ouverture du cycle de type *O*-alkyle (Figure 5). L'étape de propagation peut ensuite avoir lieu conduisant ainsi à des polyesters de structure et de masses molaires bien définies. Comme pour la polymérisation anionique des lactones non substitués, des réactions de transfert peuvent avoir lieu. Les masses molaires des polymères obtenus peuvent alors s'écarter de celles fixées par le ratio monomère/amorceur. S. Cammas *et al.*¹⁵ ont synthétisé des poly(malate de benzyle) ayant des masses molaires supérieures à 150 000 g/mol avec le benzoate de tétraéthylammonium comme amorceur. Ce travail a démontré que la purification des monomères, avant la polymérisation, était une étape clé pour obtenir des polymères ayant des masses molaires aussi élevées. Ces polymères ont été synthétisés pour être utilisés en tant que pro-drogue macromoléculaire, leurs masses molaires très élevées devant leur permettre d'éviter une élimination trop rapide par filtration rénale (le seuil de cette excrétion se situant autour de 40 000 g/mol)²⁴.

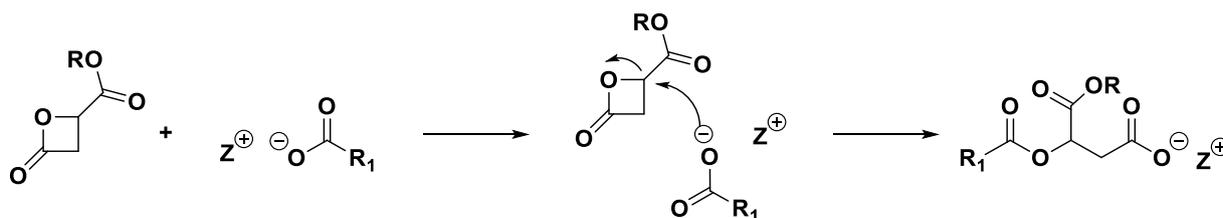


Figure 5 : Polymérisation anionique par ouverture de cycle d'une β -lactone- β -substituée

Il existe de nombreux autres amorceurs/catalyseurs utilisés/développés pour la polymérisation par ouverture de cycle (anionique ou par coordination/insertion) de monomères cycliques comme le montre les exemples suivants.

Les amorceurs/catalyseurs de types organiques, comme les amines et phosphines tertiaires ou les carbènes hétérocycliques, permettent également la synthèse de polymères de façon contrôlée²⁵. Au-delà du contrôle des structures et des masses molaires, les chimistes polyméristes développent de nouveaux catalyseurs pour, à l'instar des polymérisations de notre métabolisme cellulaire, avoir une régulation extérieure spatiale et temporelle sur la réaction de polymérisation. Par exemple, certains catalyseurs sont activables ou désactivables au cours de la réaction en modifiant certains paramètres, comme la lumière ou la présence de gaz, et vont, à l'image d'un interrupteur, activer ou arrêter la polymérisation^{26,27}. Coulembier *et al.* ont montré la capacité du couple 1,8-

diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (catalyseur organique) et d'un alcool primaire (amorceur) à passer d'une forme active à une forme dormante en présence ou en absence de CO₂. En effet, en présence de CO₂, le couple catalyseur/amorceur va fixer le CO₂, l'alcool primaire forme alors une liaison carbonate et passe de la forme active à la forme dormante (Schéma 1).

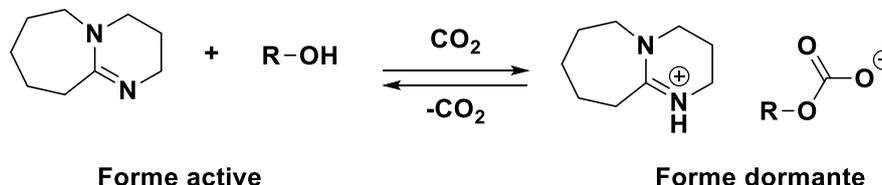


Schéma 1: Schéma réactionnel du passage réversible de la forme active à la forme dormante de l'amorceur ²⁷

Sous atmosphère inerte (N₂), le CO₂ est chassé et le couple catalyseur/amorceur redevient actif. Ce passage de l'une à l'autre des formes en changeant de gaz n'entraîne pas de pertes d'activités même en répétant les cycles.

Les amorceurs/catalyseurs métalliques, issus de métaux rares par exemple, permettent de contrôler de façon extrêmement précise les structures des polymères résultants de la polymérisation de monomères à l'aide de ces systèmes. Par exemple, pour des β-lactones-β-substituées, des catalyseurs à base d'yttrium sont capables de contrôler l'alternance des monomères *R* et *S* intégrés dans le polymère ²⁸.

Comme mentionné plus haut, en raison de la forte toxicité, ces amorceurs chimiques peuvent présenter un risque lorsque les matériaux polymères sont utilisés *in vivo* ^{16,29-31}. Des alternatives se développent afin d'apporter une réponse à ce problème, comme les exemples ci-dessous le montrent.

L'utilisation de liquides ioniques, à base de sel d'imidazolium, a été étudiée par Kaoukabi *et al.* pour la synthèse de PCL. Ainsi, en utilisant le sel d'hexafluorophosphate de 1-butyl-3-méthylimidazolium [bmim][PF₆] comme liquide ionique, ils ont obtenu des PCL ayant une masse molaire de 19 000 g/mol et une dispersité de 1,1. Dans cet exemple, la polymérisation a duré 48 h et l'alcool benzylique a servi d'amorceur (ratio molaire monomère/amorceur 200/1) ³². Cependant, l'inconvénient majeur des liquides ioniques reste leur prix. En effet, le liquide ionique cité précédemment, le [bmin][PF₆], coûte 40 € pour un gramme ; pour réaliser l'essai décrit ci-dessus, 600 mg de liquide ionique ont été utilisés.

Des catalyseurs organiques (sans métaux), en particulier l'acide borique, ont fait l'objet d'une étude en 2015³³. De bons résultats ont été obtenus en utilisant l'alcool benzylique comme amorceur. Li et son équipe ont ainsi obtenu des polymères, à partir d' ϵ -caprolactone, ayant des masses molaires supérieures à 30 000 g/mol et une dispersité de 1,4³³. Le contrôle de la réaction est correct, mais la faible réactivité de l'acide borique entraîne des temps de réaction relativement longs se comptant en jours (ici 88 h). Ren *et al.* supposent que l'acide borique active la fonction carbonyle de l' ϵ -caprolactone, comme dans le cas d'une polymérisation suivant un mécanisme passant par un monomère activé.

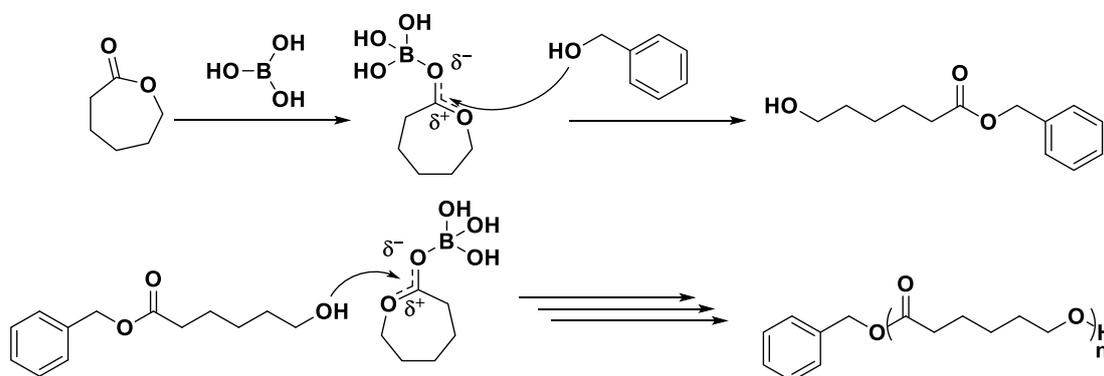


Figure 6 : Mécanisme de la polymérisation par monomère activé proposé par Ren *et al.* pour la polymérisation de l' ϵ -caprolactone en présence d'acide borique³³

La liste des catalyseurs/amorceurs présentée est loin d'être exhaustive. L'atout majeur des amorceurs (et des catalyseurs) chimiques est que ces derniers permettent de synthétiser, à façon, des polymères aux structures et caractéristiques sélectionnées en fonction de l'application visée. Par contre, ils présentent des inconvénients de toxicité et de coût important. Pour pallier à ces inconvénients, une autre voie de polymérisation utilisant des biocatalyseurs a été envisagée.

II. Polymérisation par ouverture de cycle des lactones par des lipases

Avant de nous intéresser à la réaction de polymérisation en elle-même, il est important de décrire plus en détails les lipases et leurs caractéristiques.

1. Les lipases

Les lipases sont des enzymes faisant partie de la famille des hydrolases, classe 3 dans la nomenclature EC (Enzyme Commission numbers). Plus spécifiquement, ce sont des sérines

hydrolases qui présentent la particularité d'être actives en présence d'une interface, dite d'activation, entre une phase aqueuse (eau ou tampon) et une phase organique (substrat hydrophobe et/ou solvant organique).

Présentes aussi bien chez les plantes que chez les insectes, les animaux ou les microorganismes, les lipases jouent un rôle primordial dans la dégradation et la synthèse des lipides. La réaction physiologique catalysée par les lipases est l'hydrolyse des mono-, di- et triglycérides. Toutefois, elles sont également capables de synthétiser des esters, soit par estérification soit par transestérification, lorsque l'activité de l'eau est faible (Figure 7). Cette propriété est l'une des raisons principales du grand intérêt que présente cette classe d'enzymes ³⁴, avec également leur grande sélectivité lors de l'hydrolyse.

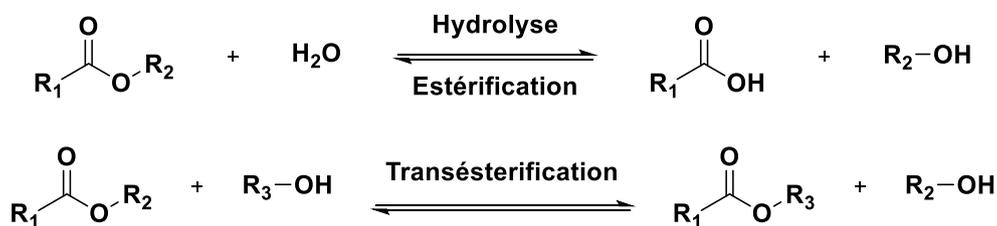


Figure 7 : Réactions catalysées par les lipases ³⁵

Domaines d'application des lipases

L'énantiosélectivité des lipases fait de ces enzymes des catalyseurs très appréciés dans le domaine de la pharmacologie. Par exemple, la résolution des mélanges racémiques des esters de l'acide 2-bromophénylacétique (intermédiaires importants dans la synthèse de médicaments comme l'ibuprofène) peut être effectuée par une lipase mutée de *Yarrowia lipolytica* avec des excès énantiomériques supérieurs à 99 % ^{36,37}. Ce domaine n'est cependant pas le seul dans lequel les lipases jouent un rôle de premier plan. En effet, ces lipases ont de nombreuses applications industrielles ³⁸ :

- L'industrie agro-alimentaire : des produits laitiers aux propriétés gustatives, olfactives ou nutritives sont fabriqués à façon par l'intermédiaire de lipases.
- L'industrie du papier : les lipases hydrolysent des cires contenues dans la pulpe de papier qui altèrent la qualité finale du papier.
- L'industrie des détergents et des lessives : le pouvoir dégraissant de ces produits est obtenu grâce à l'addition de lipases.

- L'industrie du cuir : les lipases sont utilisées avant l'étape de tannage pour supprimer les graisses contenues dans les peaux.
- L'industrie cosmétique : la production de certains émoullients est catalysée à l'aide de lipases.

Le marché mondial des lipases est en continuelle expansion et devrait atteindre les 590 millions de dollars d'ici 2020 d'après le rapport de Markets and Markets, avec un taux de croissance annuel moyen de 6,5%³⁹.

Structure tridimensionnelle

Plus de 100 structures tridimensionnelles sont déposées à la Protein Data Bank (PDB), ce qui a permis de faire ressortir des éléments structuraux très conservés propres aux lipases (Figure 8)³⁷ :

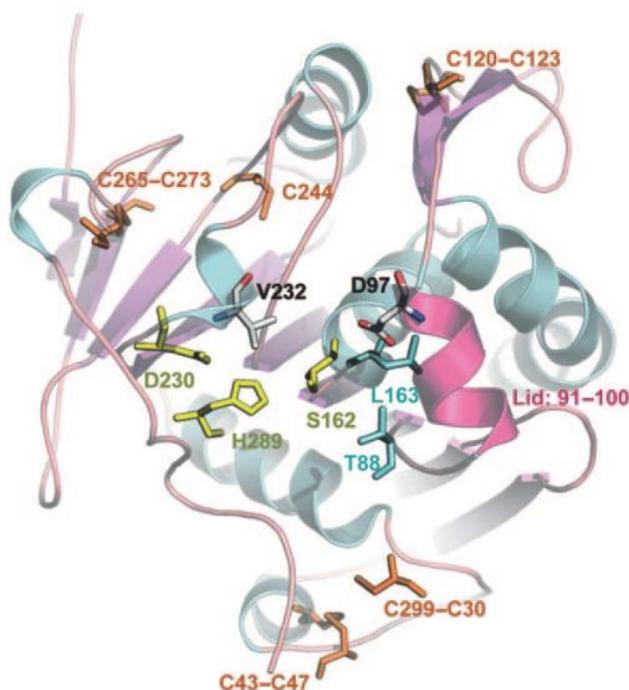


Figure 8 : Structure de la lipase Lip2 de *Y. lipolytica* obtenue par homologie de structure avec des lipases fongiques aux structures tridimensionnelles connues³⁷

- Le repliement α/β , est composé de huit feuillets β et de six hélices α . Cette structure est très largement présente chez les hydrolases de tous types, notamment les protéases. Sur la Figure 8, les huit feuillets β sont représentés en arrière-plan et en magenta et les hélices en bleu et rose.

- La triade catalytique, en jaune sur la Figure 8, est composée d'une sérine nucléophile, d'un aspartate/glutamate et d'une histidine : c'est le cœur de la machinerie enzymatique. Ces trois acides aminés sont primordiaux dans la réactivité de l'enzyme et toutes modifications entraînent la perte totale de l'activité hydrolytique.
- Le trou oxyanion, en vert sur la Figure 8, est formé par deux acides aminés (ou plus en fonction de la lipase) du site actif. Ces acides aminés vont stabiliser l'intermédiaire réactionnel enzyme/substrat par des liaisons hydrogènes entre le substrat et les azotes de la fonction amide.
- Le lid, ou couvercle, est formé par une ou plusieurs hélices α (hélice α en rose sur la Figure 8). En présence de l'interface d'activation, cette hélice va s'ouvrir pour découvrir le site actif et permettre au substrat de se positionner dans l'enzyme. Sans cette interface, le lid est clos et aucune réaction ne peut avoir lieu. Ce changement de conformation résultant de la présence d'une interface explique la différence de comportement entre la majorité des lipases et celui décrit par Michaelis-Menten.
- Le site actif, composé en majorité par des acides aminés hydrophobes, change d'une enzyme à l'autre et explique la différence de spécificité observée chez les lipases.

Réactivité des lipases

Le mécanisme d'hydrolyse des fonctions esters, dit canonique, fait intervenir les trois acides aminés de la triade catalytique, à savoir, l'aspartate, l'histidine et la sérine.

Dans un premier temps, l'acide aspartique, qui est une molécule « acide », va aligner et activer l'histidine, qui elle a un caractère « basique », qui à son tour va activer le résidu nucléophile : la sérine (Etape 1, Figure 9). L'activation de la sérine va augmenter sa réactivité et permettre ainsi l'attaque sur le carbonyle de l'ester (Etape 2, Figure 9), cette étape est une étape d'acylation. Après le passage par un état de transition tétraédrique (Etape 3, Figure 9), la reformation de la double liaison carbone – oxygène permet le clivage de la partie hydroxyle de l'ester et aboutit à la formation de l'intermédiaire covalent acyl-enzyme (Etape 4, Figure 9). La lyse de cet intermédiaire se fait par l'attaque d'une molécule d'eau préalablement activée par l'histidine. L'eau va attaquer la fonction carbonyle et un second état de transition tétraédrique est observé (Etape 5, Figure 9). La reformation de la double

liaison carbone – oxygène libre la partie acide de l'ester et l'enzyme retrouve sa conformation initiale, c'est l'étape de déacylation de l'enzyme.

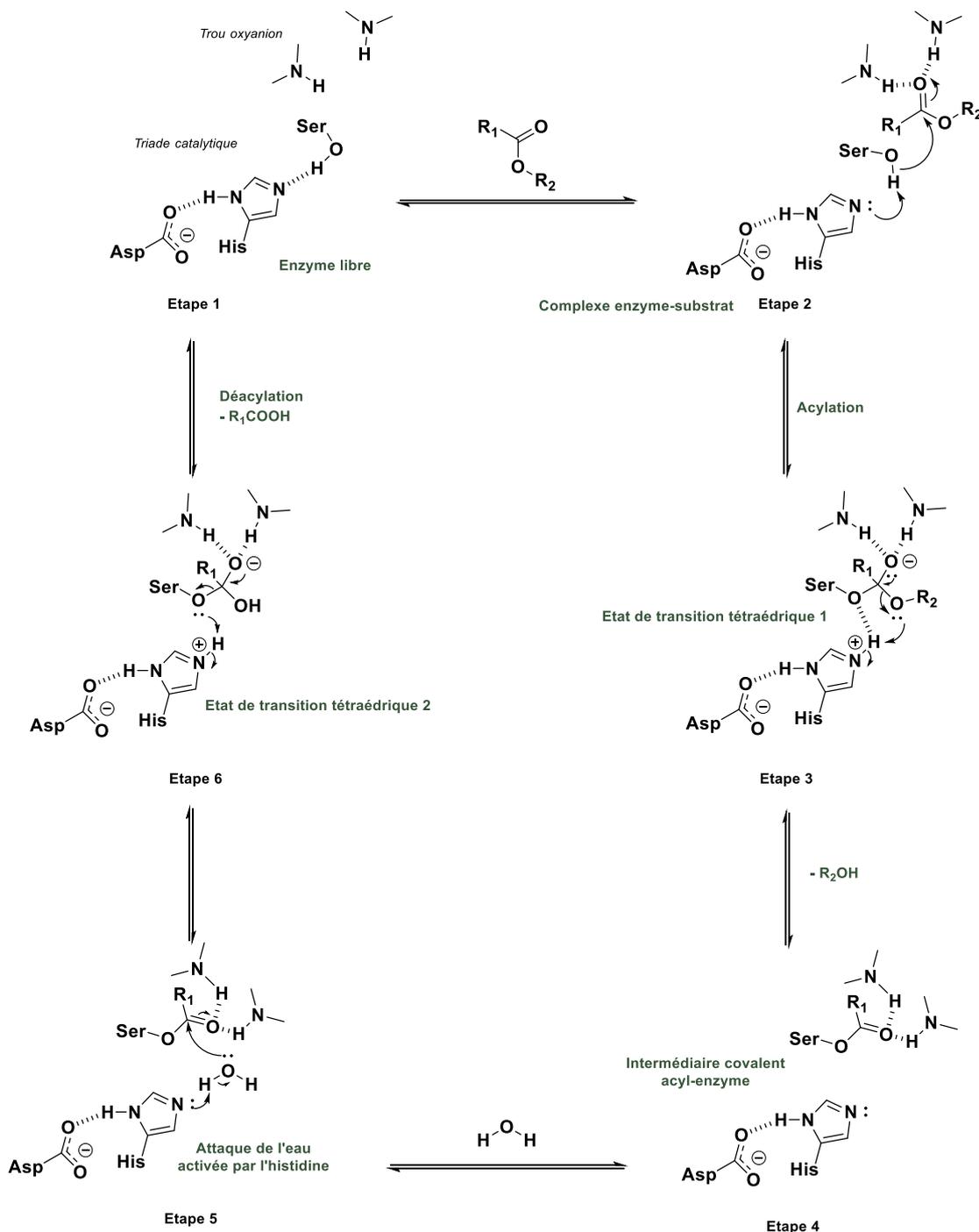
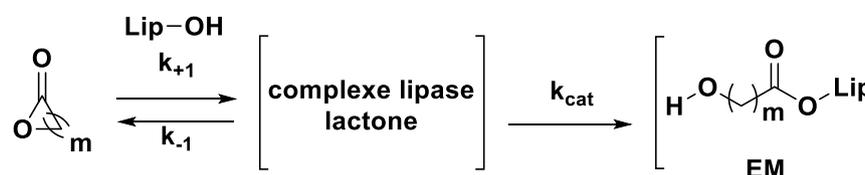


Figure 9 : Mécanisme canonique de l'hydrolyse d'un ester ⁴⁰

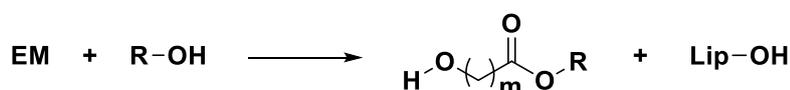
Lorsque l'étape de déacylation est plus lente que l'étape d'acylation, il est possible de cristalliser l'intermédiaire acyl-enzyme et d'observer sa structure. Ces structures et des études cinétiques détaillées ont permis de valider et de confirmer ce mécanisme canonique.

Le mécanisme de polymérisation par ouverture de cycle des lactones non substituées par des lipases est décrit dans la littérature⁴¹⁻⁴³. Il utilise ce mécanisme canonique comme base, et est largement admis par toute la communauté scientifique (Figure 10).

Formation de l'intermédiaire (EM)



Initiation



Propagation

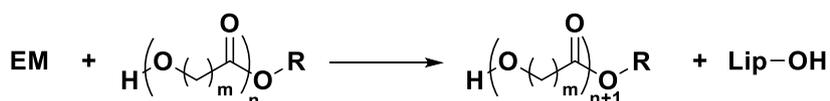


Figure 10 : Mécanisme admis de la polymérisation enzymatique par ouverture de cycle des lactones⁴⁴

2. Polymérisation des lactones non-substituées

La première polymérisation par ouverture de cycle d'une lactone non substituée, catalysée par une enzyme, date de 1993. Elle est le fruit du travail du japonais S. Kobayashi et de son équipe⁴⁵. Ils ont réussi à synthétiser un PCL, de masse molaire de 7 000 g/mol avec une dispersité de 2,2 et une conversion de 85 %. La lipase de *Pseudomonas fluorescens* a été choisie comme catalyseur de cette réaction ; la réaction de polymérisation a duré 10 jours. Même si les conditions opératoires et les résultats étaient encore perfectibles, cette publication a prouvé la possibilité de synthèse des polyesters par voie enzymatique et a permis l'émergence de nouveaux travaux dans cette direction.

Durant les années qui ont suivi ces travaux, de nombreuses enzymes ont été testées^{19,46}. Citons, parmi les plus connues, la lipase de pancréas de porc, les lipases des *Pseudomonas fluorescens* et *cepacia* et, bien sûr, celle qui est le plus couramment utilisée : la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée, aussi connue sous le nom commercial Novozym 435 ou N435^{42,44,46-48}. Les lipases sont capables de polymériser les lactones non-substituées ayant des cycles de 4 à 17 membres⁴⁴. Toutefois, l' ϵ -caprolactone (ϵ -CL) fait figure de standard dans la polymérisation par voie enzymatique de lactone, comme le montre le Tableau 2 qui

regroupe les résultats de la polymérisation de la ϵ -CL réalisée avec différentes lipases. Ce monomère est souvent utilisé comme modèle pour tester l'activité de polymérisation par ouverture de cycle d'une lipase nouvellement isolée ⁴⁹.

Tableau 2 : Masses molaires et dispersité des PCL synthétisés par voie enzymatique par différentes lipases

Origine de la lipase	Masse molaire du PCL (g/mol)	Dispersité	Référence
<i>Pseudomonas cepacia</i>	6 100	2,7	50
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7 000	2,2	50
Pancréas de porc	1 300	1,7	50
<i>Candida antarctica</i>	7 300	1,3	51
<i>Fervidobactérium nodosum</i>	2 350	1,3	49

L'inconvénient majeur de ces méthodes de polymérisation enzymatique reste les masses molaires modestes des polymères synthétisés (comprises entre 1 000 et 7 000 g/mol) et la difficulté à contrôler ces dernières. Pour remédier à cela, diverses stratégies ont été mises en place. L'utilisation de liquide ionique ⁵² comme solvant permet de limiter les problèmes de transfert de matière qui apparaissent lorsque le polymère croît et qui limitent sa masse molaire. Uyama *et al.* ont été les premiers à avoir travaillé sur la polymérisation enzymatique de l' ϵ -caprolactone en présence d'un liquide ionique (le 1-butyl-3-méthylimidazolium tétrafluoroborate). Ils ont synthétisé un PCL ayant une masse molaire de 4 200 g/mol après une semaine de réaction. Des optimisations sont donc nécessaires pour trouver quel liquide ionique s'adapte le mieux à la réaction et à l'enzyme ⁵³. Les travaux de Wu *et al.*, en 2012 ont porté sur l'utilisation d'un autre liquide ionique : le 1-dodécyl-3-méthylimidazolium bis((trifluorométhyl)-sulfonyl)imide, [C₁₂MIm][NTf₂], comme solvant de la polymérisation. En utilisant la même lipase (N435), l'utilisation de ce liquide ionique a permis la synthèse de PCL de masses molaires plus élevées (35 600 g/mol) avec une conversion de 62 % ⁵⁴. Cependant, même si cette voie semble prometteuse, la problématique du coût du liquide ionique, explicitée auparavant, est toujours présente. Toujours dans l'optique de limiter les problèmes liés à la diffusion du monomère lors de la prise en masse du milieu, R. A. Gross emploie une technologie utilisée dans l'industrie du plastique appelée, l'extrusion réactive ou REX. Cette technique consiste en deux vis sans fin qui brassent fortement le milieu réactionnel. Grâce à ce type de réacteur, son équipe synthétise des poly(ω -pentadécalactone) de masse molaire supérieure à 150 000 g/mol en 15 min avec une dispersité de 2. Ces polymères trouvent des applications dans le domaine de l'ingénierie de

réparation tissulaire, car leur forte hydrophobicité les protège mieux de la (bio)dégradation^{55,56}.

La relative robustesse des lipases permet aussi l'utilisation de procédé chimio-enzymatique. Des essais ont été menés en couplant des lipases avec de la triéthylamine (TEA)⁵⁷. Cette polymérisation chimio-enzymatique du lactide permet d'accélérer la conversion, vis-à-vis de la polymérisation enzymatique simple. En effet, une conversion supérieure à 95 % est obtenue en 24 h lorsque la TEA est présente avec le solvant (ratio toluène/triéthylamine 2/1), alors que cette conversion est obtenue en 48 h sans la TEA. Le gain sur les masses molaires des polymères reste modeste (3 500 g/mol sans TEA contre 4 900 g/mol) et l'utilisation de l'enzyme perd une partie de son intérêt. La TEA jouerait un rôle d'activateur lors de la polymérisation ce qui expliquerait l'augmentation de la vitesse de réaction. En effet, l'hypothèse, avancée par Duchiron *et al.*, est que la TEA pourrait activer :

- soit la fonction alcoolate du poly(lactide) en croissance
- soit la fonction carbonyle du lactide
- soit la sérine de la lipase comme pourrait le faire l'histidine

Lorsqu'aucun amorceur n'est rajouté dans le milieu réactionnel, l'eau, toujours présente même sous forme de traces, est la responsable de l'amorçage de la polymérisation. En effet, une fois l'attaque de la sérine réalisée sur le carbonyle et l'acyle-enzyme formée, l'eau va venir hydrolyser la fonction ester liant l'enzyme et son substrat. La présence d'acide carboxylique en fin de chaîne atteste de ce mécanisme^{42,58}. Il est cependant possible d'utiliser d'autres molécules comme amorceurs dans le but d'obtenir des polymères possédant des groupes fonctionnels bien définis à une de leurs extrémités, la structure de cette extrémité étant déterminée par celle de la molécule d'amorçage. Par exemple, l'équipe de A.C. Albertsson a utilisé le 4-pentène-2-ol et le poly(éthylène glycol) (PEG) pour obtenir des fins de chaînes fonctionnalisables ou des copolymères composés d'un bloc PCL et d'un bloc PEG⁵⁹. Il est également possible d'utiliser des sucres comme amorceurs, comme l'a démontré l'équipe de R.A. Gross⁶⁰ avec un glucopyranoside d'éthyle. Toujours dans le même objectif, à savoir obtenir des polymères facilement fonctionnalisables, l'alcool propargylique et le 4-dibenzocyclooctynol ont servi d'amorceur à la polymérisation de l' ϵ -caprolactone. Les polymères, ainsi synthétisés, possèdent alors des triples liaisons terminales pouvant être utilisées pour des réactions de « click chemistry »⁶¹. Citons

également, l'utilisation de l'ibuprofène⁶² et du 2-mercaptoéthanol⁶³ comme amorceurs qui permettent d'envisager la synthèse « one-pot » de polymères fonctionnalisés par des molécules d'intérêt.

Une autre approche originale⁴⁷ est l'utilisation de polymersomes de poly(styrène)-*bloc*-poly(isocyanopeptide) comme nanoréacteurs en milieu aqueux. L'enzyme est encapsulée dans le polymersome et les couches poreuses permettent l'arrivée des monomères (8-octanolactone) et le départ des oligomères. Cette approche, qui mime la compartimentation d'une cellule vivante, ne donne, pour l'instant, pas de résultats significatifs, mais est l'un des rares exemples de polymérisation par ouverture de cycle de lactones en milieu aqueux.

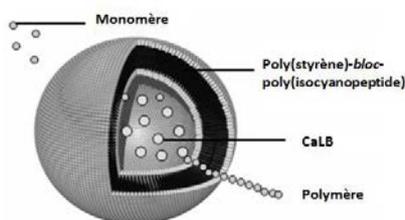


Figure 11 : Représentation des nanoréacteurs utilisés pour la polymérisation de lactone en milieu aqueux⁴⁷

Des équipes travaillent, également, sur la modification structurale de l'enzyme (ingénierie enzymatique) afin de lui permettre, soit de mieux résister aux conditions opératoires (température, solvant, agitation,...), soit de lui conférer une meilleure affinité avec le substrat⁶⁴⁻⁶⁶. Par exemple, Montanier *et al.* ont ainsi construit une banque de 1410 mutants de la lipase B de *Candida antarctica* afin d'améliorer la polymérisation de l' ϵ -caprolactone. Le mutant I285R, pour lequel l'isoleucine en position 285 a été remplacée par une arginine, catalyse trois fois plus rapidement la polymérisation. De plus, les polymères obtenus ont des masses molaires plus élevées que les masses molaires des polymères obtenus avec la lipase sauvage (21 000g/mol contre 14 000 g/mol) et la dispersité est similaire (1,8 pour les PCL synthétisés avec le mutant et 1,6 pour les PCL synthétisés avec la lipase sauvage)⁶⁶. La mutagenèse peut s'avérer un outil puissant pour l'amélioration de la réaction de polymérisation, mais une bonne connaissance de l'enzyme et du mécanisme réactionnel sont nécessaires.

Certains paramètres réactionnels de la polymérisation enzymatique des lactones ont été l'objet d'études⁴⁸, citons par exemple :

- l'influence du séchage de l'enzyme, étudiée par de Geus *et al.* Ils ont montré le rôle bivalent de l'eau, qui est à la fois nécessaire à la bonne conformation de l'enzyme mais également amorceur de la réaction. Un séchage trop brutal de l'enzyme la rend inactive, mais une trop grande présence d'eau provoque une perte de contrôle sur les fins de chaîne des polymères⁵⁸. En effet, ils ont constaté que sans traitement spécifique de la lipase N435 les fins de chaîne des PCL synthétisés était pour 40 % des fonctions acides carboxyliques, ce qui signifiait que même si la réaction était amorcée par le 2-bromoisobutyrate de 2-hydroxyéthyle, 40 % des fins de chaînes étaient ensuite transestérifiées par de l'eau. Par contre, en séchant la lipase N435 avec du tamis moléculaire, sous vide, à 50°C pendant 16 h, ce pourcentage de fonction carboxylique terminale diminue à 5 %.
- l'influence de la température, étudiée, entre autre par Ozsagiroglu *et al.*. Leurs travaux ont montré que l'augmentation de la température de 40 °C à 80 °C avait un effet bénéfique sur la vitesse de réaction (taux de conversion de 98 % atteint en 6 h à 80 °C contre 72 h à 40 °C). Par contre, les PCL obtenus avaient des masses molaires plus faibles (18 000 g/mol à 40°C contre 11 500 g/mol à 80 °C dans du toluène en utilisant N435)⁶⁷.
- l'influence de la quantité d'enzyme, étudiée par Sobczak *et al.*. L'étude menée sur la polymérisation de l' ϵ -caprolactone avec la lipase B de *Candida antarctica*, en présence de PEG, a montré que l'augmentation de la quantité d'enzyme augmentait le taux de conversion mais aussi les masses molaires des polymères obtenus. Ainsi, en doublant le ratio massique enzyme/substrat de 1,25 % à 2,5 % le taux de conversion augmentait de 49 à 85 % et la masse molaire des PCL augmentait de 2 900 g/mol à 4 400 g/mol⁶⁸.
- l'influence de la polarité, étudiée récemment par Li *et al.*. Leurs travaux ont permis d'expliquer pourquoi les polymérisations étaient plus efficaces dans les solvants apolaires. En effet, les modélisations dynamiques effectuées ont montré que les solvants polaires avaient la capacité de rentrer dans le site catalytique de l'enzyme et de gêner l'activation de la sérine par l'histidine⁶⁹.

Le Tableau 3 récapitule les différentes méthodes citées précédemment et utilisées pour polymériser les lactones non-substituées, par voie enzymatique.

Tableau 3 : Récapitulatif de certaines des techniques de polymérisations enzymatiques

Auteur	Uyama	Wu	Spinella	Duchiron	Srivastava	Bisht	Nallani
Référence	45	54	55	57	59	60	47
Enzyme	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée (N435)	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée (N435)	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée (N435)	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée (N435)	Lipase de pancréas de porc	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée (N435)
Monomère	ϵ -caprolactone	ϵ -caprolactone	ω -pentadécalactone	Lactide	ϵ -caprolactone (amorceur : PEG ₁₀₀₀)	ϵ -caprolactone (amorceur : éthylglucoside)	δ -octanolactone
\overline{M}_w (g/mol)	7 000	356 000	150 000	2 000	12 000	2 200	2 700
\overline{D}	2,2	/	2	/	1,3	1,3	/
Originalité	1 ^{ère} polymérisation enzymatique de lactones	Utilisation de liquide ionique comme solvant pour faciliter le transfert de matière	Utilisation d'extrusion réactive (REX) pour faciliter le transfert de matière	Polymérisation chimio-enzymatique, utilisation de triéthylamine pour améliorer la conversion	Utilisation d'alcool comme amorceur pour obtenir des polymères fonctionnalisés ou des copolymères	Utilisation de sucre comme amorceur	Utilisation de polymersomes pour une polymérisation en milieu aqueux qui mime la compartimentation cellulaire

Auteur	Montanier	De Geus	Ozsagioglu	Sobczak	Li	Uyama
Référence	66	58	67	68	69	53
Enzyme	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> mutée	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée (N435)	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée (N435)	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée (N435)	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> immobilisée (N435)	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
Monomère	ϵ -caprolactone	ϵ -caprolactone	ϵ -caprolactone	ϵ -caprolactone	/	ϵ -caprolactone
\overline{M}_w (g/mol)	21 000	6 350	18 000	4 400	/	4 200
\overline{D}	1,8	2	1,5	1,2	/	2,7
Originalité	Ingénierie enzymatique pour augmenter la vitesse de conversion	Etude approfondie de l'effet du séchage de l'enzyme sur la polymérisation	Etude de l'effet de la température sur la polymérisation	Etude de l'effet de la quantité d'enzyme sur la polymérisation	Modélisation de l'effet de la polarité des solvants sur la réactivité de l'enzyme	Utilisation de liquides ioniques comme solvant de la réaction de polymérisation

3. Polymérisation des lactones α/β méthylées

Des travaux ont également été menés sur des lactones chirales présentant un groupement méthyle en α ou β du carbonyle. L'objectif de ces travaux était d'obtenir une méthodologie pour parvenir à la résolution du mélange racémique par voie enzymatique et, en parallèle, de synthétiser des polymères enrichis en un des deux énantiomères.

Kobayashi *et al.*, ainsi que Wang *et al.* ont étudié la polymérisation de la β -butyrolactone (Figure 12, à gauche) ⁷⁰⁻⁷². En utilisant une lipase thermophile, ils sont parvenus à synthétiser des poly(3-hydroxybutyrate) enrichis en énantiomère *R* présentant un excès énantiomérique de 37 %, une masse molaire de 2 800 g/mol et une dispersité de 1,8 après 66 h de réaction à 80 °C.

Gross *et al.*, ont réussi à polymériser l' α -méthyle- β -propiolactone (Figure 12, à droite) en utilisant la lipase de *Pseudomonas fluorescens* ⁷³. Un polymère *S*-enrichi à plus de 75 % a été synthétisé après 72h à 35 °C : il a une masse molaire de 2 900 g/mol et une dispersité de 1,7.



Figure 12 : Lactones chirales α/β méthylées

Les mécanismes proposés pour ces lactones α/β méthylées suivent également le mécanisme canonique proposé pour les lactones non-substituées ⁷³ (Figure 10).

4. Polymérisation des lactones substituées

La polymérisation enzymatique des lactones substituées est moins décrite que la polymérisation des autres lactones et, à notre connaissance, traite exclusivement de β -lactones- β -substituées pour la synthèse de dérivées du poly(acide malique).

Panova *et al.* ont synthétisé des poly(malate de propyle) par réaction de la lactone correspondante (Figure 13) en présence de la lipase de *Candida rugosa* ⁷⁴. La réaction a lieu à 60 °C pendant 8 h, en mettant en mélange la lactone dans du toluène (2,1 mol/L) et 10 % massique de lipase. Dans ces conditions, le poly(malate de propyle) obtenu possède une masse molaire de 5 000 g/mol et une dispersité de 1,2. De plus, lors de ces travaux, les

auteurs ont constaté que des réactions secondaires avaient lieu limitant ainsi les masses molaires des polymères. En effet, ils ont détecté, à la fin de certaines chaînes de polymères, des unités de répétition ayant des doubles liaisons. Cette structure particulière est le résultat d'un arrachement d'un proton en α de la fonction carbonyle. La molécule, ainsi formée (Figure 13), ne pourrait plus servir à la propagation enzymatique, car elle ne possède plus de fonction alcoolate. En effet, dans le mécanisme proposé, la lipase provoque l'ouverture de la lactone en *O*-acyle en formant l'acyle-enzyme. Puis, l'eau (amorçage) ou l'alcoolate du polymère en croissance (propagation) viendrait réagir sur la fonction ester liant l'enzyme et le substrat (mécanisme canonique, Figure 10).

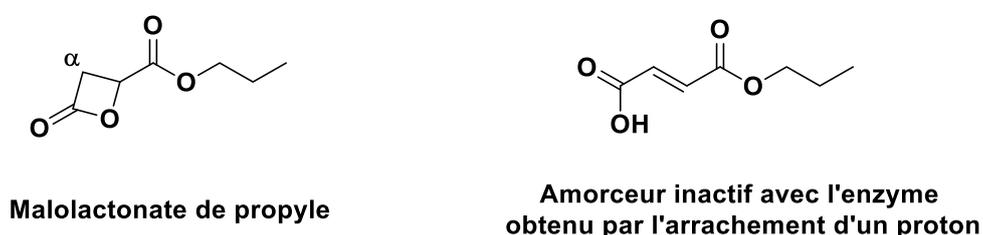


Figure 13 : Monomère et amorceur décrit dans les travaux de Panova *et al.* ⁷⁴

Matsumura *et al.* ont, quant à eux, synthétisé un poly(malate de benzyle-co-propiolactone), à partir de malolactonate de benzyle (Figure 14) et de β -propiolactone. Ils ont montré que l'ajout d'une faible quantité de β -propiolactone (17 % massique avant la polymérisation) permettait d'obtenir des polymères avec des masses molaires 4 fois supérieures (32 000g/mol avec la β -propiolactone et 8 000 g/mol sans) en conservant une dispersité semblable (1,6 avec et 1,4 sans) ^{75,76}.

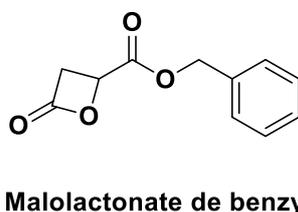


Figure 14 : Malolactonates d'alkyle

Par contre, et contrairement aux autres lactones citées plus haut (lactones non-substituées et lactones α ou β -méthylées), le mécanisme de polymérisation enzymatique des malolactonates d'alkyle n'est toujours pas élucidé. La question « la polymérisation enzymatique de malolactonate d'alkyle suit-elle le même mécanisme que celui décrit pour la

polymérisation chimique (Figure 5) ou celui décrit par Kobayashi (Figure 10) pour les lactones non substituées ? » est toujours sans réponse actuellement.

III. Conclusions

Les voies de synthèse des polyesters aliphatiques, par polymérisation par ouverture de cycle, présentent toutes des avantages et des inconvénients récapitulés dans le Tableau 4⁷⁷.

Tableau 4 : Comparaison des différentes polymérisations par ouverture de cycle.

Voie de synthèse	Catalyseurs/Amorceurs	Avantages	Inconvénients
Anionique	Alcoolates, organométalliques, amines, phosphines	Masses molaires élevées, polymérisations contrôlées.	Traces de métaux, ou d'amorceurs présentant des risques pour des applications biomédicales. Catalyseurs coûteux.
Coordination-insertion	Acide de Lewis métallique type Sn (II)		
Enzymatique	Lipases	Non toxiques, produites à partir de sources renouvelables	Masses molaires peu élevées et forte dispersité

L'objectif de cette thèse est de synthétiser des poly(malate de benzyle) par voie enzymatique en réduisant au maximum les inconvénients liés à ce type de polymérisation c'est-à-dire des masses molaires peu élevées et une forte dispersité.

Pour atteindre cet objectif, l'optimisation des conditions opératoires est nécessaire. Cette recherche des paramètres optimaux est décrite dans le Chapitre 1.

Références bibliographiques

- (1) Hong, M.; Chen, E. Y.-X. Chemically Recyclable Polymers: A Circular Economy Approach to Sustainability. *Green Chem* **2017**, *19* (16), 3692–3706 DOI: 10.1039/C7GC01496A.
- (2) The New Plastics Economy: Rethinking the future of plastics <https://www.ellenmacarthurfoundation.org/news/the-new-plastics-economy-rethinking-the-future-of-plastics-infographics> (accessed Oct 23, 2017).
- (3) Moulay, S. Bref Historique Des Polymères. *Actualité Chimique* **1999**, *12*, 31–43.
- (4) Feldman, D. Polymer History. *Des. Monomers Polym.* **2008**, *11* (1), 1–15 DOI: 10.1163/156855508X292383.
- (5) Mülhaupt, R. Green Polymer Chemistry and Bio-Based Plastics: Dreams and Reality. *Macromol. Chem. Phys.* **2013**, *214* (2), 159–174 DOI: 10.1002/macp.201200439.
- (6) Kale, G.; Kijchavengkul, T.; Auras, R.; Rubino, M.; Selke, S. E.; Singh, S. P. Compostability of Bioplastic Packaging Materials: An Overview. *Macromol. Biosci.* **2007**, *7* (3), 255–277 DOI: 10.1002/mabi.200600168.
- (7) Sauer, A.; Kapelski, A.; Fliedel, C.; Dagorne, S.; Kol, M.; Okuda, J. Structurally Well-Defined Group 4 Metal Complexes as Initiators for the Ring-Opening Polymerization of Lactide Monomers. *Dalton Trans.* **2013**, *42* (25), 9007–9023 DOI: 10.1039/C3DT00010A.
- (8) Philip, S.; Keshavarz, T.; Roy, I. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Polymers with a Range of Applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, *82* (3), 233–247 DOI: 10.1002/jctb.1667.
- (9) Chaturvedi, D.; Mishra, S.; Tandon, P.; Portilla-Arias, J. A.; Muñoz-Guerra, S. Thermal Degradation and Theoretical Interpretation of Vibrational Spectra of Poly (β ,L-Malic Acid). *Polymer* **2011**, *52* (14), 3118–3126 DOI: 10.1016/j.polymer.2011.05.011.
- (10) Tanzi, M. C.; Verderio, P.; Lampugnani, M. G.; Resnati, M.; Dejana, E.; Sturani, E. Cytotoxicity of Some Catalysts Commonly Used in the Synthesis of Copolymers for Biomedical Use. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1994**, *5* (6–7), 393–396 DOI: 10.1007/BF00058971.
- (11) Loyer, P.; Cammas-Marion, S. Natural and Synthetic Poly(Malic Acid)-Based Derivates: A Family of Versatile Biopolymers for the Design of Drug Nanocarriers. *J. Drug Target.* **2014**, *22* (7), 556–575 DOI: 10.3109/1061186X.2014.936871.
- (12) Huang, Z. W.; Laurent, V.; Chetouani, G.; Ljubimova, J. Y.; Holler, E.; Benvegna, T.; Loyer, P.; Cammas-Marion, S. New Functional Degradable and Bio-Compatible Nanoparticles Based on Poly(Malic Acid) Derivatives for Site-Specific Anti-Cancer Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423* (1), 84–92 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.04.035.
- (13) Jaffredo, C. G.; Guillaume, S. M. Benzyl β -Malolactonate Polymers: A Long Story with Recent Advances. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (14), 4168–4194 DOI: 10.1039/C4PY00170B.
- (14) Coulembier, O.; Degée, P.; Cammas-Marion, S.; Guérin, P.; Dubois, P. New Amphiphilic Poly[(R,S)- β -Malic Acid-b- ϵ -Caprolactone] Diblock Copolymers by Combining Anionic and Coordination-Insertion Ring-Opening Polymerization. *Macromolecules* **2002**, *35* (27), 9896–9903 DOI: 10.1021/ma0209500.
- (15) Cammas, S.; Renard, I.; Langlois, V.; Guerin, P. Poly(β -Malic Acid): Obtaining High Molecular Weights by Improvement of the Synthesis Route. *Polymer* **1996**, *37* (18), 4215–4220 DOI: 10.1016/0032-3861(96)00204-2.
- (16) Tetraethylammonium. *DrugBank*; DrugBank, Ed.
- (17) Kobayashi, S. Enzymatic Polymerization: A New Method of Polymer Synthesis. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **1999**, *37* (16), 3041–3056 DOI: 10.1002.
- (18) Kobayashi, S. Green Polymer Chemistry: New Methods of Polymer Synthesis Using Renewable Starting Materials. *Struct. Chem.* **2016** DOI: 10.1007/s11224-016-0861-3.
- (19) Albertsson, A. C.; Srivastava, R. K. Recent Developments in Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization. *Adv Drug Deliv Rev* **2008**, *60* (9), 1077–1093 DOI: 10.1016/j.addr.2008.02.007.
- (20) Albertsson, A.-C.; Varma, I. K. Recent Developments in Ring Opening Polymerization of Lactones for Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (6), 1466–1486 DOI: 10.1021/bm034247a.
- (21) Mabillic, C.; Masure, M.; Hémerly, P.; Guérin, P. Obvious Complexity of the Anionic Polymerization of Malolactonic Acid Esters. *Polym. Bull.* **1998**, *40* (4–5), 381–387 DOI: 10.1007/s002890050266
- (22) Jelle Dijkstra, P.; Du, H.; Feijen, J. Single Site Catalysts for Stereoselective Ring-Opening Polymerization of Lactides. *Polym. Chem.* **2011**, *2* (3), 520–527 DOI: 10.1039/C0PY00204F.

- (23) Penczek, S.; Cypryk, M.; Duda, A.; Kubisa, P.; Słomkowski, S. Living Ring-Opening Polymerizations of Heterocyclic Monomers. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32* (2), 247–282 DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.01.002.
- (24) Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L.; Duval, D. *Atlas de poche de pharmacologie*; Flammarion médecine-science: Paris, 2010.
- (25) Kamber, N. E.; Jeong, W.; Waymouth, R. M.; Pratt, R. C.; Lohmeijer, B. G. G.; Hedrick, J. L. Organocatalytic Ring-Opening Polymerization. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (12), 5813–5840 DOI: 10.1021/cr068415b.
- (26) Neilson, B. M.; Bielawski, C. W. Photoswitchable NHC-Promoted Ring-Opening Polymerizations. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2013**, *49* (48), 5453–5455 DOI: 10.1039/c3cc42424c.
- (27) Coulembier, O.; Moins, S.; Todd, R.; Dubois, P. External and Reversible CO₂ Regulation of Ring-Opening Polymerizations Based on a Primary Alcohol Propagating Species. *Macromolecules* **2014**, *47* (2), 486–491 DOI: 10.1021/ma4024944.
- (28) Jaffredo, C. G.; Chapurina, Y.; Kirillov, E.; Carpentier, J.-F.; Guillaume, S. M. Highly Stereocontrolled Ring-Opening Polymerization of Racemic Alkyl β -Malolactonates Mediated by Yttrium [Amino-Alkoxy-Bis(Phenolate)] Complexes. *Chem. – Eur. J.* **2016**, *22*, 7629–7641 DOI: 10.1002/chem.201600223.
- (29) Nijenhuis, A. J.; Grijpma, D. W.; Pennings, A. J. Lewis Acid Catalyzed Polymerization of L-Lactide. Kinetics and Mechanism of the Bulk Polymerization. *Macromolecules* **1992**, *25* (24), 6419–6424 DOI: 10.1021/ma00050a006.
- (30) Thomas, C.; Milet, A.; Peruch, F.; Bibal, B. Activation of Carbonyl Bonds by Quaternary Ammoniums and a (Na⁺ : Crown - Ether) Complex: Investigation of the Ring-Opening Polymerization of Cyclic Esters. *Polym. Chem.* **2013**, *4* (12), 3491–3498 DOI: 10.1039/C3PY00304C.
- (31) Nachtergaele, A.; Coulembier, O.; Dubois, P.; Helvenstein, M.; Duez, P.; Blankert, B.; Mespouille, L. Organocatalysis Paradigm Revisited: Are Metal-Free Catalysts Really Harmless? *Biomacromolecules* **2015**, *16* (2), 507–514 DOI: 10.1021/bm5015443.
- (32) Kaoukabi, A.; Guillen, F.; Qayouh, H.; Bouyahya, A.; Balieu, S.; Belachemi, L.; Gouhier, G.; Lahcini, M. The Use of Ionic Liquids as an Organocatalyst for Controlled Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *72*, 16–23 DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.02.002.
- (33) Ren, Y.; Wei, Z.; Leng, X.; Wang, Y.; Li, Y. Boric Acid as Biocatalyst for Living Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone. *Polymer* **2015**, *78*, 51–58 DOI: 10.1016/j.polymer.2015.09.063.
- (34) Casas-Godoy, L.; Duquesne, S.; Bordes, F.; Sandoval, G.; Marty, A. Lipases: An Overview. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2012**, *861*, 3–30 DOI: 10.1007/978-1-61779-600-5_1.
- (35) Godoy, L. C. Lipase-Catalyzed Purification and Functionalization of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Production of Structured Lipids, INSA de Toulouse, 2012.
- (36) Guieysse, D.; Sandoval, G.; Faure, L.; Nicaud, J.-M.; Monsan, P.; Marty, A. New Efficient Lipase from *Yarrowia Lipolytica* for the Resolution of 2-Bromo-Arylacetic Acid Esters. *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, *15* (22), 3539–3543 DOI: 10.1016/j.tetasy.2004.09.008.
- (37) Bordes, F.; Cambon, E.; Dossat-Létisse, V.; André, I.; Croux, C.; Nicaud, J. M.; Marty, A. Improvement of *Yarrowia Lipolytica* Lipase Enantioselectivity by Using Mutagenesis Targeted to the Substrate Binding Site. *ChemBioChem* **2009**, *10* (10), 1705–1713 DOI: 10.1002/cbic.200900215.
- (38) Andualema, B.; Gessesse, A. Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review. *Biotechnology* **2012**, *11* (3), 100–118 DOI: 10.3923/biotech.2012.100.118.
- (39) Markets and Markets. Lipase Market worth \$590.5 Million by 2020 <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/lipase.asp> (accessed Feb 10, 2016).
- (40) Rauwerdink, A.; Kazlauskas, R. J. How the Same Core Catalytic Machinery Catalyzes 17 Different Reactions: The Serine-Histidine-Aspartate Catalytic Triad of α/β -Hydrolase Fold Enzymes. *ACS Catal.* **2015**, *5* (10), 6153–6176 DOI: 10.1021/acscatal.5b01539.
- (41) MacDonald, R. T.; Pulapura, S. K.; Svirkin, Y. Y.; Gross, R. A.; Kaplan, D. L.; Akkara, J.; Swift, G.; Wolk, S. Enzyme-Catalyzed ϵ -Caprolactone Ring-Opening Polymerization. *Macromolecules* **1995**, *28* (1), 73–78 DOI: 10.1021/ma00105a008.
- (42) Henderson, L. A.; Svirkin, Y. Y.; Gross, R. A.; Kaplan, D. L.; Swift, G. Enzyme-Catalyzed Polymerizations of ϵ -Caprolactone: Effects of Initiator on Product Structure, Propagation Kinetics, and Mechanism. *Macromolecules* **1996**, *29* (24), 7759–7766 DOI: 10.1021/ma960821h.
- (43) Johnson, P. M.; Kundu, S.; Beers, K. L. Modeling Enzymatic Kinetic Pathways for Ring-Opening Lactone Polymerization. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (9), 3337–3343 DOI: 10.1021/bm2009312.
- (44) Shoda, S.; Uyama, H.; Kadokawa, J.; Kimura, S.; Kobayashi, S. Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (4), 2307–2413 DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00472.

- (45) Uyama, H.; Takeya, K.; Kobayashi, S. Synthesis of Polyesters by Enzymatic Ring-Opening Copolymerization Using Lipase Catalyst. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **1993**, *69* (8), 203–207 DOI: 10.2183/pjab.69.203.
- (46) Kobayashi, S. Enzymatic Ring-Opening Polymerization and Polycondensation for the Green Synthesis of Polyesters. *Polym. Adv. Technol.* **2015**, *26* (7), 677–686 DOI: 10.1002/pat.3564.
- (47) Nallani, M.; de Hoog, H.-P. M.; Cornelissen, J. J. L. M.; Palmans, A. R. A.; van Hest, J. C. M.; Nolte, R. J. M. Polymersome Nanoreactors for Enzymatic Ring-Opening Polymerization. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (12), 3723–3728 DOI: 10.1021/bm7005938.
- (48) Champagne, E.; Strandman, S.; Zhu, X.-X. Recent Developments and Optimization of Lipase-Catalyzed Lactone Formation and Ring-Opening Polymerization. *Macromol. Rapid Commun.* **2016** DOI: 10.1002/marc.201600494.
- (49) Li, Q.; Li, G.; Yu, S.; Zhang, Z.; Ma, F.; Feng, Y. Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone Catalyzed by a Novel Thermophilic Lipase from *Fervidobacterium Nodosum*. *Process Biochem.* **2011**, *46* (1), 253–257 DOI: 10.1016/j.procbio.2010.08.019.
- (50) Kobayashi, S.; Takeya, K.; Suda, S.; Uyama, H. Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Medium-Size Lactones to Polyesters. *Macromol. Chem. Phys.* **1998**, *199* (8), 1729–1736 DOI: 10.1002/(SICI)1521-3935(19980801)199:8<1729::AID-MACP1729>3.0.CO;2-V.
- (51) Stavila, E.; Alberda van Ekenstein, G. O. R.; Woortman, A. J. J.; Loos, K. Lipase-Catalyzed Ring-Opening Copolymerization of ϵ -Caprolactone and β -Lactam. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (1), 234–241 DOI: 10.1021/bm401514k.
- (52) Piotrowska, U.; Sobczak, M. Enzymatic Polymerization of Cyclic Monomers in Ionic Liquids as a Prospective Synthesis Method for Polyesters Used in Drug Delivery Systems. *Molecules* **2014**, *20* (1), 1–23 DOI: 10.3390/molecules20010001.
- (53) Uyama, H.; Takamoto, T.; Kobayashi, S. Enzymatic Synthesis of Polyesters in Ionic Liquids. *Polym. J.* **2002**, *34* (2), 94–96.
- (54) Wu, C.; Zhang, Z.; He, F.; Zhuo, R. Enzymatic Synthesis of Poly(ϵ -Caprolactone) in Monocationic and Dicationic Ionic Liquids. *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35* (6), 879–885 DOI: 10.1007/s10529-013-1160-3.
- (55) Spinella, S.; Ganesh, M.; Re, G. L.; Zhang, S.; Raquez, J.-M.; Dubois, P.; Gross, R. A. Enzymatic Reactive Extrusion: Moving towards Continuous Enzyme-Catalysed Polyester Polymerisation and Processing. *Green Chem.* **2015**, *17* (8), 4146–4150 DOI: 10.1039/C5GC00992H.
- (56) Focarete, M. L.; Gualandi, C.; Scandola, M.; Govoni, M.; Giordano, E.; Foroni, L.; Valente, S.; Pasquinelli, G.; Gao, W.; Gross, R. A. Electrospun Scaffolds of a Polyhydroxyalkanoate Consisting of ω -Hydroxypentadecanoate Repeat Units: Fabrication and In Vitro Biocompatibility Studies. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2010**, *21* (10), 1283–1296 DOI: 10.1163/092050609X12517190417597.
- (57) Duchiron, S. W.; Pollet, E.; Givry, S.; Avérous, L. Mixed Systems to Assist Enzymatic Ring Opening Polymerization of Lactide Stereoisomers. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 84627–84635 DOI: 10.1039/C5RA18954C.
- (58) de Geus, M. Enzymatic Catalysis in the Synthesis of New Polymer Architectures and Materials, Eindhoven University of Technology: Eindhoven, 2007.
- (59) Srivastava, R. K.; Albertsson, A.-C. Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Seven-Membered Ring Lactones Leading to Terminal-Functionalized and Triblock Polyesters. *Macromolecules* **2006**, *39* (1), 46–54 DOI: 10.1021/ma0518508.
- (60) Bisht, K. S.; Deng, F.; Gross, R. A.; Kaplan, D. L.; Swift, G. Ethyl Glucoside as a Multifunctional Initiator for Enzyme-Catalyzed Regioselective Lactone Ring-Opening Polymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (7), 1363–1367 DOI: 10.1021/ja972391w.
- (61) Castano, M.; Zheng, J.; Puskas, J. E.; Becker, M. L. Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone Using Alkyne Functionalized Initiators. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (6), 1891–1896 DOI: 10.1039/C3PY01536J.
- (62) Qian, X.; Wang, J.; Li, Y.; Lin, X.; Wu, Q. Two Enzyme Cooperatively Catalyzed Tandem Polymerization for the Synthesis of Polyester Containing Chiral (R)- or (S)-Ibuprofen Pendants. *Macromol. Rapid Commun.* **2014**, *35*, 1788–1794 DOI: 10.1002/marc.201400394.
- (63) Hedfors, C.; Östmark, E.; Malmström, E.; Hult, K.; Martinelle, M. Thiol End-Functionalization of Poly(ϵ -Caprolactone), Catalyzed by *Candida Antarctica* Lipase B. *Macromolecules* **2005**, *38* (3), 647–649 DOI: 10.1021/ma048056r.
- (64) Takwa, M.; Larsen, M. W.; Hult, K.; Martinelle, M. Rational Redesign of *Candida Antarctica* Lipase B for the Ring Opening Polymerization of D,D-Lactide. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2011**, *47* (26), 7392–7394 DOI: 10.1039/c1cc10865d.

- (65) Bassegoda, A.; Cesarini, S.; Diaz, P. Lipase Improvement: Goals and Strategies. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2012**, *2* (3) DOI: 10.5936/csbj.201209005.
- (66) Montanier, C. Y.; Chabot, N.; Emond, S.; Guieysse, D.; Remaud-Siméon, M.; Peruch, F.; André, I. Engineering of *Candida Antarctica* Lipase B for Poly(ϵ -Caprolactone) Synthesis. *Eur. Polym. J.* **2017**, *95*, 809–819 DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2017.07.029.
- (67) Erhan Ozsagioglu. Effects of Different Reaction Mediums on Ring Opening Polymerization of Poly(ϵ -Caprolactone) by Lipase. *Afr. J. Biotechnol.* **2012**, *11* (63) DOI: 10.5897/AJB12.1811.
- (68) Sobczak, M. Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Cyclic Esters in the Presence of Poly(Ethylene Glycol). *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *125* (5), 3602–3609 DOI: 10.1002/app.36396.
- (69) Li, C.; Tan, T.; Zhang, H.; Feng, W. Analysis of the Conformational Stability and Activity of *Candida Antarctica* Lipase B in Organic Solvents: Insight from Molecular Dynamics and Quantum Mechanics/Simulations. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (37), 28434–28441 DOI: 10.1074/jbc.M110.136200.
- (70) Kikuchi, H.; Uyama, H.; Kobayashi, S. Lipase-Catalyzed Enantioselective Copolymerization of Substituted Lactones to Optically Active Polyesters. *Macromolecules* **2000**, *33* (24), 8971–8975 DOI: 10.1021/ma0010534.
- (71) Kikuchi, H.; Uyama, H.; Kobayashi, S. Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Substituted Lactones. *Polym. J.* **2002**, *34* (11), 835–840 DOI: 10.1295/polymj.34.835.
- (72) Xie, W.; Li, J.; Chen, D.; Wang, P. G. Ring-Opening Polymerization of β -Butyrolactone by Thermophilic Lipases. *Macromolecules* **1997**, *30* (22), 6997–6998 DOI: 10.1021/ma970722j.
- (73) Svirkin, Y. Y.; Xu, J.; Gross, R. A.; Kaplan, D. L.; Swift, G. Enzyme-Catalyzed Stereoelective Ring-Opening Polymerization of α -Methyl- β -Propiolactone. *Macromolecules* **1996**, *29* (13), 4591–4597 DOI: 10.1021/ma951868q.
- (74) Panova, A. A.; Taktak, S.; Randriamahefa, S.; Cammas-Marion, S.; Guerin, P.; Kaplan, D. L. Polymerization of Propyl Malolactonate in the Presence of *Candida Rugosa* Lipase. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (1), 19–27 DOI: 10.1021/bm0255746.
- (75) Matsumura, S.; Beppu, H.; Toshima, K. Enzymatic Preparation of Malate-Based Polycarboxylates Having Higher Molecular Weights by Copolymerization with Lactone. *Chem. Lett.* **1999**, No. 3, 249–250 DOI: 10.1246/cl.1999.249.
- (76) Matsumura, S.; Beppu, H.; Nakamura, K.; Osanai, S.; Toshima, K. Preparation of Poly(β -Malic Acid) by Enzymatic Ring-Opening Polymerization of Benzyl β -Malolactonate. *Chem. Lett.* **1996**, No. 9, 795–796 DOI: 10.1246/cl.1996.795.
- (77) Washington, K. E.; Kularatne, R. N.; Karmegam, V.; Biewer, M. C.; Stefan, M. C. Recent Advances in Aliphatic Polyesters for Drug Delivery Applications. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2016**, *9* (4) DOI: 10.1002/wnan.1446.

Chapitre 1

Optimisation des conditions
expérimentales de la polymérisation
enzymatique du malolactonate de benzyle

Chapitre 1 : Optimisation des conditions expérimentales de la polymérisation enzymatique du malolactonate de benzyle

La polymérisation enzymatique de lactones non-substituées (γ -butyrolactone, δ -valérolactone, ϵ -caprolactone et autres) a largement été étudiée depuis les années 80-90 ^{1,2}. Par contre, celle des lactones substituées, comme le malolactonate de benzyle (MLABe), est beaucoup moins décrite ³.

La première polymérisation enzymatique du MLABe a été réalisée en 1996 par le japonais Matsumura *et al.* ⁴. Plus récemment, Panova *et al.* ont également étudié la polymérisation enzymatique du malolactonate de propyle en présence de la lipase de *Candida rugosa* ⁵. Malgré des résultats encourageants, ces publications étaient, avant nos travaux ⁶, les seules références de polymérisation enzymatique de malolactonates. Par conséquent, de nombreuses voies d'amélioration étaient envisageables.

Des travaux préliminaires ont été menés, d'abord pour reproduire les travaux de Matsumura, puis pour tenter de les améliorer. Ainsi, l'effet de divers paramètres (ratio enzyme/MLABe, ratio phase aqueuse/phase organique et vitesse d'agitation) a été étudié. Toutefois, devant le grand nombre de paramètres pouvant influencer la réaction, une méthodologie plus adaptée a été choisie, celle du plan d'expérience.

I. Les plans d'expérience

Le plan d'expérience est une méthode rationnelle qui permet de déterminer et de hiérarchiser les paramètres influents d'une réaction tout en minimisant la quantité d'expérience à réaliser. Il vise à maximiser le ratio informations/nombre d'essais ⁷.

La conduite du plan d'expérience s'articule en trois temps bien distincts.

D'abord, il y a la conception, c'est la partie primordiale dans laquelle les objectifs du plan d'expérience sont explicités, les réponses et les facteurs choisis. Cette étape aboutit à la construction de la matrice expérimentale, sorte de carnet de route dans lequel tous les essais à mener et les valeurs des différents paramètres sont décrits.

Vient ensuite la partie expérimentale à proprement parler durant laquelle l'expérimentateur réalise l'ensemble des essais en suivant méthodiquement les consignes de la matrice expérimentale.

Enfin, la dernière partie consiste en l'analyse des données recueillies et doit permettre d'atteindre les buts fixés dans la première partie. Lorsque les objectifs ne sont pas remplis, une dernière partie peut s'ajouter : elle consiste en l'extrapolation des résultats obtenus en dehors du domaine délimité par le plan d'expérience pour essayer d'atteindre les objectifs.

Cette démarche est encore peu utilisée dans le domaine de la polymérisation enzymatique, toutefois la littérature rapporte quelques exemples de plan d'expérience utilisés pour des réactions enzymatiques.

En 2006, Lohit *et al.* ont décrit l'utilisation d'un plan d'expérience pour l'estérification de la L-phénylalanine et du D-glucose en utilisant la lipase du champignon *Rhizomucor miehei* (RML)⁸. L'objectif était d'obtenir la conversion maximale du D-glucose en L-phénylalaninyl-D-glucose en faisant varier cinq paramètres expérimentaux : (i) la quantité de L-phénylalanine (de 1 à 5 mmol), (ii) la masse de RML (de 27 à 135 mg), (iii) le temps de la réaction (de 24 à 120 h), (iv) le pH (de 4 à 8), et (v) la concentration (de 0,1 à 0,5 mM) du tampon. Une fois les 32 essais de la matrice expérimentale réalisés et l'analyse des résultats effectuée, ils en ont déduit les valeurs des différents paramètres à utiliser pour obtenir une conversion théorique du D-glucose de 100 %. Ils ont donc réalisé un essai en utilisant les valeurs des paramètres définies par le plan d'expérience à savoir : 3 mmol de L-phénylalanine, 100 mg de lipase RML, un temps d'incubation de 24 h, un tampon acétate (CH₃COONa) à 0,5 mM, un pH de 4,8. Ils ont obtenu le produit désiré avec une conversion de 97 %.

En 2015, Makareviciene *et al.* ont décrit la transestérification de l'huile de lin et du gras de porc avec de l'éthanol en utilisant la lipase commerciale Novozym® Lipex 100L issue du champignon *Thermomyces lanuginosa*⁹. L'objectif était d'augmenter le pourcentage de transestérification pour la synthèse de biodiesel de 2^{ème} génération en utilisant des sources non-alimentaires. L'influence de quatre paramètres a été étudiée : (i) la température (de 30 à 60 °C), (ii) le temps de la réaction (de 1 à 8 h), (iii) la concentration en lipase (de 3 à 10 %), et (iv) le ratio éthanol/matière grasse variant de 4 à 6.

Après optimisation des paramètres, ils réussirent à atteindre un pourcentage de transestérification de 52 %. Les conditions retenues pour atteindre ce pourcentage étaient une température de 33 °C, un temps de 8h, une concentration en enzyme de 6,4 % et un ratio éthanol/matière grasse de 6.

Ces deux exemples démontrent l'utilité de cette démarche car les objectifs fixés ont pu être atteints en optimisant rapidement un grand nombre de paramètres.

La polymérisation enzymatique des β -lactones- β -substituées est, comme toutes les réactions chimiques, soumise à l'influence d'un grand nombre de paramètres, la méthodologie du plan d'expérience semble donc appropriée.

La Figure 15 regroupe les différentes étapes menées lors d'un plan d'expérience. Chaque étape sera décrite plus en détails et exemplifiée dans la partie suivante en utilisant notre plan d'expérience comme modèle.

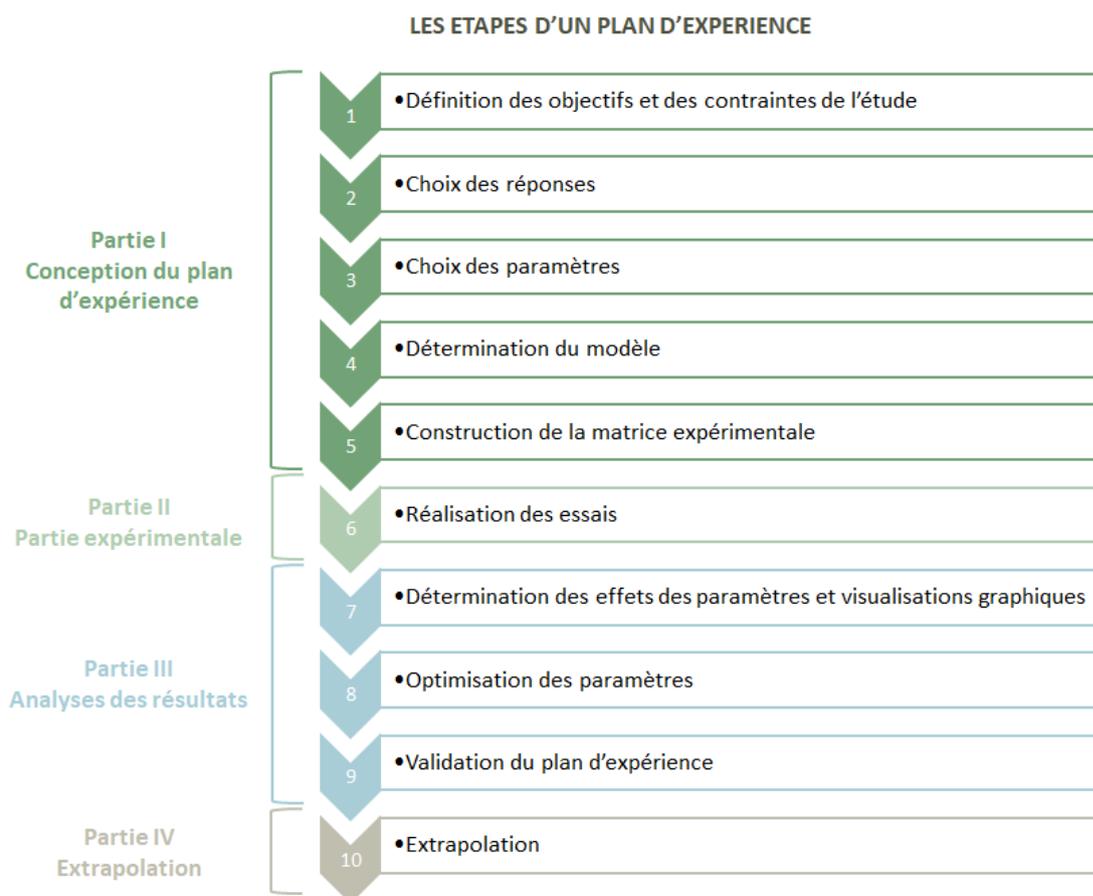


Figure 15 : Les différentes étapes d'un plan d'expérience

II. Construction, réalisation, analyse et extrapolation de notre plan d'expérience

1. Définitions des objectifs et contraintes de l'étude

La première question à se poser, lors de la construction d'un plan d'expérience, est celle de l'objectif que nous souhaitons atteindre. Dans notre cas, cet objectif est double. En effet, le plan d'expérience vise, à la fois, l'identification des paramètres qui influencent la réaction, et aussi, l'établissement d'un modèle prédictif pour optimiser la réaction de polymérisation.

Pour obtenir ce plan d'expérience, le nombre d'essai maximal est fixé à 100, par souci d'économie de temps et de moyen.

2. Choix des réponses

Les réponses choisies doivent caractériser plus précisément l'objectif défini précédemment en lui associant des valeurs chiffrables. Elles doivent être mesurables de manière facile et précise. En effet, des erreurs de mesure trop importantes risquent de masquer l'influence de certains paramètres.

Pour cette étude quatre réponses ont été choisies : (i) le taux de conversion (Y1), (ii) le taux d'hydrolyse de la chaîne latérale (Y2), (iii) la masse molaire moyenne en masse (Y3), et (iv) la dispersité (Y4) des polymères produits. Ces réponses caractérisent à la fois la réaction de polymérisation en elle-même et les polymères produits au cours de celle-ci.

Ce choix nous permet d'affiner les objectifs du plan d'expérience. Concrètement, ce plan d'expérience doit permettre de trouver les valeurs des paramètres pour obtenir des polymères ayant des masses molaires supérieures à 5 000 g/mol en ayant un taux de conversion supérieure à 80 %, un taux d'hydrolyse inférieur à 5 % et une dispersité inférieure à 1,4. Les polymères ainsi obtenus présenteront les caractéristiques physico-chimiques suffisantes pour être formulés sous forme de nanoparticules.

Taux de conversion et taux d'hydrolyse.

L'analyse par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H) du brut réactionnel permet de déterminer à la fois le taux de conversion et le taux d'hydrolyse.

En considérant que toutes les réactions autres que la polymérisation de la lactone (déprotonation) soient négligeables alors, le taux de conversion correspond au pourcentage

de lactone transformée en polymère. Un taux de conversion de 90% signifie que 90% de la lactone initialement présente a été polymérisée.

Par RMN ^1H , le taux de conversion, noté X, est déterminé comme suit :

$$X = 1 - \frac{I_{\text{lactone}}}{I_{\text{lactone}} + I_{\text{polymère}}}$$

avec :

I_{lactone} la valeur de l'intégration d'un pic caractéristique de la lactone valant pour 1 proton (Figure 16)

$I_{\text{polymère}}$ la valeur de l'intégration correspondant à l'intégrale d'un massif caractéristique du polymère valant pour $1n$ protons avec n degré de polymérisation (Figure 16)

Le MLABe que nous utilisons comme monomère possède une fonction ester susceptible d'être hydrolysée par les lipases dans certaines conditions. Cette hydrolyse entraîne la libération dans le milieu d'alcool benzylique. L'analyse RMN ^1H permet d'observer et de quantifier l'alcool benzylique dans notre milieu et donc d'estimer un taux d'hydrolyse.

Par RMN ^1H , le taux d'hydrolyse, noté H, est déterminé comme suit :

$$H = \frac{I_{\text{alcool benzylique}}}{2I_{\text{polymère}}}$$

avec :

$I_{\text{alcool benzylique}}$ la valeur de l'intégration du pic caractéristique de l'alcool benzylique valant pour 2 protons (Figure 16)

$I_{\text{polymère}}$ la valeur de l'intégration d'un massif caractéristique du polymère valant pour $1n$ protons avec n degré de polymérisation (Figure 16)

La Figure 16 représente un exemple typique de spectre RMN ^1H obtenu pour une expérience du plan d'expérience. Les zones des trois pics caractéristiques qui nous intéressent (lactone, polymère et alcool benzylique) sont agrandies. Les protons caractérisés par ces pics sont en couleur sur les formules des espèces.

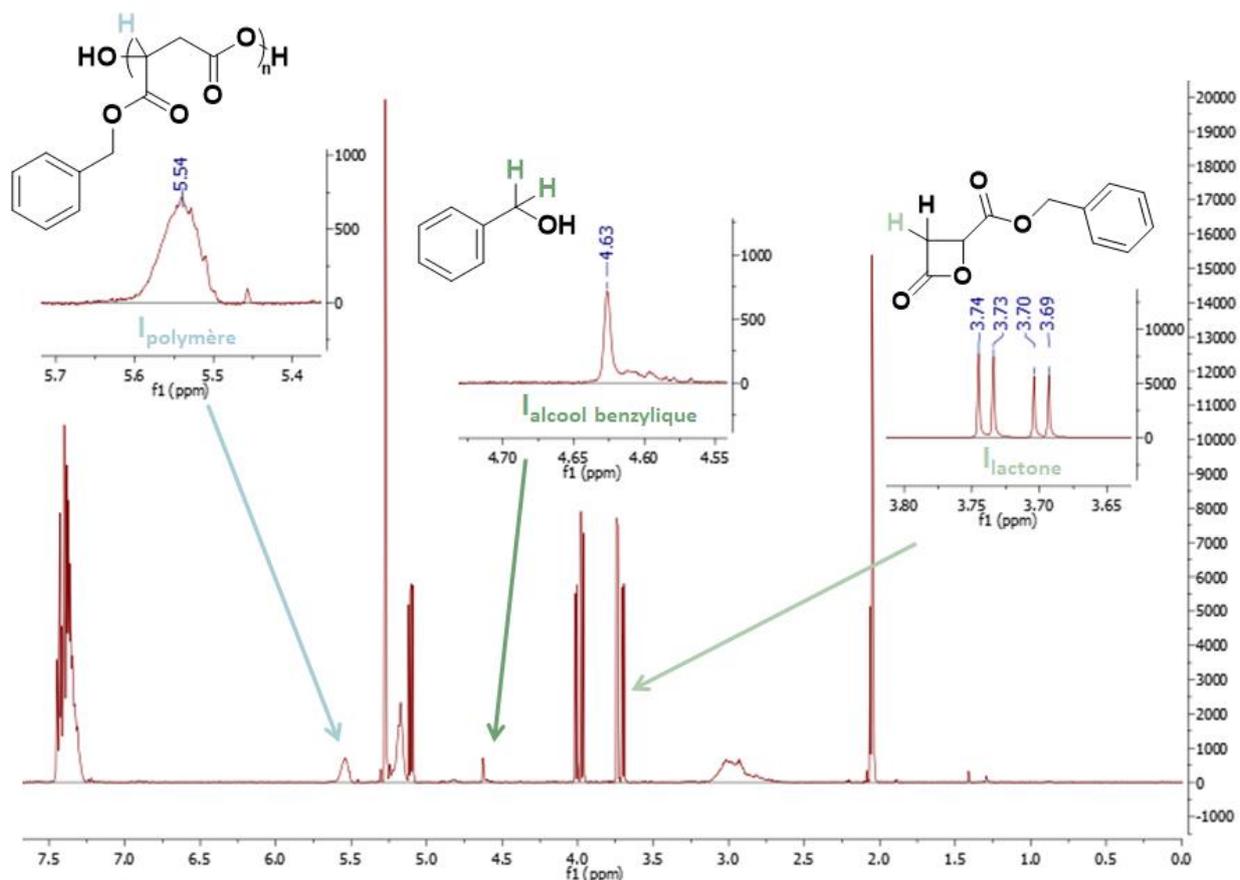


Figure 16 : Spectre RMN 1H (acétone-d6) permettant la détermination du taux de conversion et du taux d'hydrolyse

Masse molaire moyenne en masse et dispersité

Les polymères, même lorsqu'ils sont purs (sans autres contaminants), restent un mélange de plusieurs molécules ayant des masses molaires différentes. Ils sont donc caractérisés par des masses molaires moyennes. De plus, afin de mesurer la dispersion des différentes masses molaires, la dispersité du polymère est mesurée.

En fonction des calculs effectués, plusieurs masses molaires moyennes peuvent être calculées. Les deux principales sont : la masse molaire moyenne en nombre notée \overline{M}_n et la masse molaire moyenne en masse notée \overline{M}_w .

La masse molaire moyenne en nombre est la moyenne des masses molaires pondérée par le nombre de chaîne de chaque longueur soit :

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$

avec :

i le degré de polymérisation

M_i la masse molaire des chaînes de degré de polymérisation i

N_i le nombre de chaîne de masse molaires M_i

La masse molaire moyenne en masse est la moyenne des masses molaires pondérée par la masse de chaînes de chaque longueur.

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_i m_i M_i}{\sum_i m_i} = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$$

avec :

i le degré de polymérisation

M_i la masse molaire des chaînes de degré de polymérisation *i*

N_i le nombre de chaîne de masse molaire M_i

m_i la masse des chaînes de degré de polymérisation *i*

La dispersité, notée \mathfrak{D} , renseigne sur la dispersion d'un échantillon, pour un polymère idéal, isomoléculaire, cet indice est égal à 1. Il correspond au rapport de la masse molaire moyenne en masse sur la masse molaire moyenne en nombre.

$$\mathfrak{D} = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$$

Ces trois grandeurs caractéristiques des polymères sont déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

Le Tableau 5 regroupe les différentes réponses choisies ainsi que la méthode d'analyse permettant leurs mesures.

Tableau 5 : Réponses choisies pour le plan d'expérience

Y	Nom de la réponse	Méthode d'analyse
Y1	Taux de conversion X%	RMN ^1H
Y2	Taux d'hydrolyse H%	RMN ^1H
Y3	Masse molaire moyenne en masse \overline{M}_w	SEC
Y4	Dispersité \mathfrak{D}	SEC

3. Choix des paramètres

Les premiers essais effectués pour reproduire les résultats obtenus par Matsumura et ceux décrits dans la littérature, nous ont permis de dégager six paramètres ayant potentiellement une importance sur la polymérisation et les polymères obtenus^{4,8,9}. Il s'agit (i) du ratio massique enzyme/monomère (X1), (ii) du ratio en volume phase aqueuse (tampon)/phase organique (monomère dissous dans le toluène) (X2), (iii) de la vitesse d'agitation (X3), (iv) de la concentration en MLABe dans le solvant (X4), (v) de la température (X5), et (vi) de la concentration du tampon (X6). Ces paramètres ont été sélectionnés car ils couvrent un large

spectre des phénomènes physico-chimiques qui interviennent lors d'une réaction de polymérisation enzymatique. Le ratio massique enzyme/monomère, par analogie avec le ratio monomère/amorçeur en polymérisation chimique, peut influencer sur la masse molaire des polymères. Le ratio en volume phase aqueuse/phase organique et la vitesse de rotation agit sur la surface interfaciale, lieu d'action des lipases. La concentration du MLABe dans le toluène influence la viscosité du monomère et donc les phénomènes de transfert de masse. La température influe à la fois sur la vitesse de réaction et sur la stabilité de l'enzyme. La concentration du tampon influence, quant à elle, l'activité de l'enzyme.

Il faut également déterminer l'intervalle d'étude de chaque paramètre (Tableau 6). Les bornes des intervalles sont soit liées à des contraintes pratiques (au-delà d'une agitation de 480 rpm l'appareil ne reste plus en place), ou à des valeurs limites fournies par la littérature (perte d'activité significative de la lipase au-delà de 60°C¹⁰). Les bornes de l'intervalle seront ensuite transformées en valeurs centrées réduites, ce qui signifie que la borne basse de l'intervalle sera égale à -1 et la borne haute à 1. Cette méthode permet d'homogénéiser les valeurs des intervalles quelles que soit la valeur initiale de l'intervalle.

Tableau 6 : Paramètres étudiés

X	Nom du paramètre	Valeur -1	Valeur +1
X1	Ratio enzyme/substrat	1 : 40	1 : 10
X2	Ratio tampon/toluène	1 : 2	2 : 1
X3	Vitesse de rotation	300 rpm	480 rpm
X4	[MLABe] _{toluène}	0,58 M	2,45 M
X5	Température	40 °C	60 °C
X6	Concentration du tampon	10 mM	200 mM

Pour ne pas alourdir le plan d'expérience, seuls des paramètres quantitatifs ont été choisis, les paramètres qualitatifs, tels que la nature de l'enzyme ou du tampon, seront étudiés séparément. Pour ce plan d'expérience, l'enzyme sélectionnée est la lipase du pancréas de porc, qui est une enzyme abondante et bon marché. Le tampon choisi est le tampon Tris/HCl à un pH de 7, tampon couramment utilisé pour les réactions enzymatiques.

4. Détermination du modèle

Un modèle mathématique est établi dans lequel sont représentés les différents effets des facteurs. Un facteur peut avoir un effet linéaire sur la réponse ($Y = aX + b$), quadratique ($Y = aX^2 + bX + c$) ou d'ordre supérieur dans des cas extrêmement rares. Le modèle prend

aussi en compte les interactions possibles entre deux facteurs ($Y(X_1, X_2) = aX_1X_2 + b$), là aussi des interactions d'ordre supérieur à 2 sont rares.

Pour cette étude, les paramètres sont supposés avoir des effets quadratiques sur la réponse. Cette hypothèse est la plus large puisque, si le facteur a un effet linéaire, le coefficient devant le terme au carré sera nul.

Trois interactions seront étudiées :

- l'interaction ratio enzyme/substrat et ratio tampon/toluène
- l'interaction ratio enzyme/substrat et concentration du MLABe dans le toluène
- l'interaction ratio tampon/toluène et concentration du MLABe dans le toluène

Ces différents facteurs influencent les quantités finales d'enzymes et de MLABe présentent dans les différentes phases, il est donc possible que des interactions entre les facteurs existent, elles ont donc été prises en compte dans le modèle mathématique.

Le modèle théorique (Équation 1) établi pour chaque réponse est le suivant :

Équation 1 : Modèle mathématique théorique

$$Y(X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6) = a_0 + a_1 X_1 + a_{11} X_1^2 + a_2 X_2 + a_{22} X_2^2 + a_3 X_3 + a_{33} X_3^2 + a_4 X_4 + a_{44} X_4^2 + a_5 X_5 + a_{55} X_5^2 + a_6 X_6 + a_{66} X_6^2 + a_{12} X_1 X_2 + a_{14} X_1 X_4 + a_{24} X_2 X_4$$

5. Construction de la matrice expérimentale

Les paramètres et le modèle mathématique du plan d'expérience ont été étudiés avec le Professeur D. Wolbert afin que le meilleur jeu d'expériences à réaliser puisse être déterminé.

Dans un premier temps, le plan factoriel complet soit, dans ce cas, 729 expériences (6 paramètres à 3 niveaux $3^6 = 729$) est déterminé. Ensuite, la matrice de covariance de ce plan est calculée (Tableau 7). Les valeurs données sur la diagonale de cette matrice représentent les variances de chaque coefficient ; les autres termes correspondent aux covariances, lorsque ce terme est nul cela signifie qu'il n'y a pas de corrélation entre un facteur et un autre. La corrélation entre deux facteurs est à éviter le plus possible. En effet, lorsque deux facteurs corrélerent, il est difficile de conclure. Par exemple, si les facteurs X_1 et

X2 sont jugés comme ayant une influence grâce au plan mais que ceux-ci corrèlent, il est possible qu'un des deux facteurs entraîne avec lui le second et, qu'en réalité, un seul des deux facteurs soit réellement important.

Tableau 7 : Matrice de covariance du plan complet

Var./Cov.	Moy.	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X1*X1	X2*X2	X3*X3	X4*X4	X5*X5	X6*X6	X1*X2	X1*X4	X2*X4
Moy.	0,0178															
X1	0	0,021														
X2	0	0	0,021													
X3	0	0	0	0,021												
X4	0	0	0	0	0,021											
X5	0	0	0	0	0	0,021										
X6	0	0	0	0	0	0	0,021									
X1*X1	-0,041	0	0	0	0	0	0	0,062								
X2*X2	-0,041	0	0	0	0	0	0	0	0,062							
X3*X3	-0,041	0	0	0	0	0	0	0	0	0,062						
X4*X4	-0,041	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,062					
X5*X5	-0,041	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,062				
X6*X6	-0,041	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,062			
X1*X2	-0,041	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,031		
X1*X4	-0,041	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,031	
X2*X4	-0,041	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,031

Le Tableau 7 présente donc la meilleure matrice pouvant être obtenue. En effet, les plans factoriels complets sont ceux qui apportent le plus d'informations et permettent l'étude de modèles complexes, par contre ils conduisent à un nombre de combinaisons quasi irréalizable lorsque le nombre de paramètres est supérieur à 4 ou 5⁷. Les termes de covariances observées entre les termes d'ordre 2 et la moyenne sont inévitables et liés au modèle quadratique choisi précédemment (Équation 1). Pour obtenir cette matrice de covariance, il faudrait réaliser 729 expériences, ce qui n'est pas envisageable. A la contrainte initiale de 100 expériences, s'ajoute une contrainte supplémentaire du fait de l'utilisation du multi-réacteur. En effet, la température et la vitesse d'agitation dans chaque tube sont obligatoirement les mêmes (combinaison X3/X5).

Les différentes possibilités de plans d'expériences qui peuvent être utilisées dans notre cas sont regroupées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Types de plans d'expériences pouvant être utilisés

Type de plan d'expérience	Nombre d'expériences minimales pour un modèle quadratique à 6 facteurs*	Commentaires	Nombre minimum de combinaison de X3/X5	Références
Plan factoriel complet	719 (3^6)	Charge de travail importante	9	11,12
Plan centré composite	76	<i>Centré composite circonscrit</i> : requiert des facteurs en dehors du plan; <i>Centré composite inscrit</i> : ne donne pas la même qualité de prédiction sur l'ensemble de l'espace du plan ; <i>Centré composite face centrée</i> : faible précision pour déterminer les valeurs des termes quadratiques	9	8,9
Box-Behnken	49	Contient des régions où la qualité de prédiction est faible (coins de l'espace du plan)	9	13,14
D-optimisé	> 16	Cherche à minimiser la covariance des paramètres estimés pour un modèle spécifique et un nombre d'essais donné	5	15

*ne prend pas en compte les répliquas ou les points supplémentaires au centre

Le plan D-optimisé a été choisi car il s'adapte le mieux à nos contraintes, le nombre d'essais minimal est faible (16) et le nombre minimum de combinaisons de X3/X5 est le plus faible de tous (5 contre 9 pour les autres types de plan). Les 84 expériences réalisées en plus ne sont pas inutiles car elles permettent d'augmenter la précision du plan et de limiter les effets de covariances.

Le plan va donc être découpé en 5 parties (séquence de 20 essais). Dans une même partie, le couple température/vitesse d'agitation sera le même pour les 20 tubes : cinq couples différents de température/vitesse d'agitation ont donc été testés.

Le sous plan D-optimisé est déterminé grâce à un solveur à partir du plan factoriel complet. Il est obtenu en minimisant le déterminant de la matrice de covariance. Le solveur va donc devoir déterminer le jeu d'expérience (matrice d'état, Tableau 9) permettant d'avoir le déterminant de la matrice de covariance le plus faible.

La matrice d'état du plan d'expérience obtenue grâce au solveur est donc la suivante :

Tableau 9 : Matrice d'état du plan optimisé

N°	X1	X2	X3	X4	X5	X6	N°	X1	X2	X3	X4	X5	X6	N°	X1	X2	X3	X4	X5	X6	N°	X1	X2	X3	X4	X5	X6	N°	X1	X2	X3	X4	X5	X6
1	1	1	1	-1	-0,2	-1	21	1	1	-1	-1	-1	-1	41	1	1	0,2	-1	-1	-1	61	1	1	1	-1	1	-1	81	1	1	-0,4	-1	-0,5	-1
2	1	-1	1	-1	-0,2	1	22	1	-1	-1	-1	-1	1	42	1	-1	0,2	-1	-1	1	62	1	-1	1	-1	1	1	82	1	-1	-0,4	1	-0,5	1
3	1	0	1	1	-0,2	-1	23	1	0	-1	1	-1	-1	43	1	0	0,2	1	-1	-1	63	1	0	1	1	1	-1	83	1	0	-0,4	-1	-0,5	-1
4	1	0	1	-1	-0,2	0	24	1	0	-1	-1	-1	0	44	1	0	0,2	-1	-1	0	64	1	0	1	-1	1	0	84	1	0	-0,4	0	-0,5	0
5	1	-1	1	0	-0,2	-1	25	1	-1	-1	0	-1	-1	45	1	-1	0,2	0	-1	-1	65	1	-1	1	0	1	-1	85	1	-1	-0,4	-1	-0,5	-1
6	-1	-1	1	1	-0,2	1	26	-1	-1	-1	1	-1	1	46	-1	-1	0,2	1	-1	1	66	-1	-1	1	1	1	1	86	-1	-1	-0,4	1	-0,5	1
7	-1	0	1	0	-0,2	0	27	-1	0	-1	0	-1	0	47	-1	0	0,2	0	-1	0	67	-1	0	1	0	1	0	87	-1	0	-0,4	0	-0,5	0
8	-1	-1	1	1	-0,2	-1	28	-1	-1	-1	1	-1	-1	48	-1	-1	0,2	1	-1	-1	68	-1	-1	1	1	1	-1	88	-1	-1	-0,4	-1	-0,5	-1
9	-1	1	1	-1	-0,2	0	29	-1	1	-1	-1	-1	0	49	-1	1	0,2	-1	-1	0	69	-1	1	1	-1	1	0	89	-1	1	-0,4	0	-0,5	0
10	0	1	1	1	-0,2	0	30	0	1	-1	1	-1	0	50	0	1	0,2	1	-1	0	70	0	1	1	1	1	0	90	0	1	-0,4	0	-0,5	0
11	0	0	1	0	-0,2	1	31	0	0	-1	0	-1	1	51	0	0	0,2	0	-1	1	71	0	0	1	0	1	1	91	0	0	-0,4	1	-0,5	1
12	0	1	1	0	-0,2	-1	32	0	1	-1	0	-1	-1	52	0	1	0,2	0	-1	-1	72	0	1	1	0	1	-1	92	0	1	-0,4	-1	-0,5	-1
13	0	-1	1	-1	-0,2	0	33	0	-1	-1	-1	-1	0	53	0	-1	0,2	-1	-1	0	73	0	-1	1	-1	1	0	93	0	-1	-0,4	0	-0,5	0
14	-1	-1	1	-1	-0,2	-1	34	-1	-1	-1	-1	-1	-1	54	-1	-1	0,2	-1	-1	-1	74	-1	-1	1	-1	1	-1	94	-1	-1	-0,4	-1	-0,5	-1
15	-1	1	1	1	-0,2	-1	35	-1	1	-1	1	-1	-1	55	-1	1	0,2	1	-1	-1	75	-1	1	1	1	1	-1	95	-1	1	-0,4	-1	-0,5	-1
16	-1	1	1	-1	-0,2	1	36	-1	1	-1	-1	-1	1	56	-1	1	0,2	-1	-1	1	76	-1	1	1	-1	1	1	96	-1	1	-0,4	1	-0,5	1
17	1	1	1	1	-0,2	1	37	1	1	-1	1	-1	1	57	1	1	0,2	1	-1	1	77	1	1	1	1	1	1	97	1	1	-0,4	1	-0,5	1
18	1	-1	1	1	-0,2	0	38	1	-1	1	1	-1	0	58	1	-1	0,2	1	-1	0	78	1	-1	1	1	1	0	98	1	-1	-0,4	0	-0,5	0
19	1	1	1	0	-0,2	0	39	1	1	-1	0	-1	0	59	1	1	0,2	0	-1	0	79	1	1	1	0	1	0	99	1	1	-0,4	0	-0,5	0
20	0	0	1	-1	-0,2	-1	40	0	0	-1	-1	-1	-1	60	0	0	0,2	-1	-1	-1	80	0	0	1	-1	1	-1	100	0	0	-0,4	-1	-0,5	-1

Les facteurs X3 et X5 ont 4 niveaux (3 pour les autres) car ils correspondent, respectivement, à la vitesse d'agitation et à la température qui restent fixes pour chaque séquence. Ils sont optimisés à part, et le niveau supplémentaire qu'ils prennent permet de diminuer le déterminant de la matrice de covariance (Tableau 10).

Tableau 10 : Matrice de covariance du plan optimisé

Var./Cov	Moy.	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X1*X1	X2*X2	X3*X3	X4*X4	X5*X5	X6*X6	X1*X2	X1*X4	X2*X4
Moy.	0,136															
X1	-0,003	0,014														
X2	-0,004	0	0,014													
X3	0,004	0	0	0,014												
X4	0,002	0	0	0	0,016											
X5	-0,003	0	0	0	0	0,021										
X6	0,004	0	0	0	0	-0,009	0,022									
X1*X1	-0,031	-0,004	0,003	-0,003	-0,001	0	0	0,066								
X2*X2	-0,028	0,003	-0,002	-0,003	-0,001	0	0	-0,011	0,059							
X3*X3	-0,028	0,003	0,003	0,002	-0,001	0	0	-0,011	-0,009	0,059						
X4*X4	-0,026	0,002	0,001	-0,001	0,004	0	0	-0,003	-0,002	-0,002	0,047					
X5*X5	0,001	0	0	-0,002	0,001	0	0	0,001	0,001	0	-0,003	0,018				
X6*X6	-0,001	0	-0,002	0	-0,001	0	0	-0,001	0	-0,001	0,003	0,003	0,018			
X1*X2	-0,005	-0,003	0	0	0	0	0	0,012	-0,002	-0,002	-0,001	0	0	0,019		
X1*X4	-0,034	0	0	0	0	-0,006	-0,004	0	0	0	0	0	0	0	0,059	
X2*X4	-0,031	0	0	0	0	0,003	0,007	0	0	0	0	0	0	0	-0,007	0,056

Les termes de covariances les plus élevés sont, comme précédemment, ceux qui lient la moyenne aux termes quadratiques et directement liés à la construction du plan. D'autres

termes de covariances existent, ils devront donc être pris en compte lors de l'interprétation des résultats.

6. Réalisation des essais

La matrice d'état qui explicite, pour chaque essai, le niveau de chaque facteur en coordonnées centrées réduites, est transformée pour obtenir les valeurs réelles de chaque facteur (Tableau 11).

Tableau 11 : Matrice des conditions opératoires

N°	Ratio Enz. : Sub.	Ratio Tamp. : Tol.	Vitesse de rotation (rpm)	[Sub] _{toluène} (M)	T. (°C)	[Tamp.] (mM)	N°	Ratio Enz. : Sub.	Ratio Tamp. : Tol.	Vitesse de rotation (rpm)	[Sub] _{toluène} (M)	T. (°C)	[Tamp.] (mM)
1	0,1000	2,00	480	0,49	48	10	51	0,0625	1,25	420	1,47	40	200
2	0,1000	0,50	480	0,49	48	200	52	0,0625	2,00	420	1,47	40	10
3	0,1000	1,25	480	2,45	48	10	53	0,0625	0,50	420	0,49	40	105
4	0,1000	1,25	480	0,49	48	105	54	0,0250	0,50	420	0,49	40	10
5	0,1000	0,50	480	1,47	48	10	55	0,0250	2,00	420	2,45	40	10
6	0,0250	0,50	480	2,45	48	200	56	0,0250	2,00	420	0,49	40	200
7	0,0250	1,25	480	1,47	48	105	57	0,1000	2,00	420	2,45	40	200
8	0,0250	0,50	480	2,45	48	10	58	0,1000	0,50	420	2,45	40	105
9	0,0250	2,00	480	0,49	48	105	59	0,1000	2,00	420	1,47	40	105
10	0,0625	2,00	480	2,45	48	105	60	0,0625	1,25	420	0,49	40	10
11	0,0625	1,25	480	1,47	48	200	61	0,1000	2,00	480	0,49	60	10
12	0,0625	2,00	480	1,47	48	10	62	0,1000	0,50	480	0,49	60	200
13	0,0625	0,50	480	0,49	48	105	63	0,1000	1,25	480	2,45	60	10
14	0,0250	0,50	480	0,49	48	10	64	0,1000	1,25	480	0,49	60	105
15	0,0250	2,00	480	2,45	48	10	65	0,1000	0,50	480	1,47	60	10
16	0,0250	2,00	480	0,49	48	200	66	0,0250	0,50	480	2,45	60	200
17	0,1000	2,00	480	2,45	48	200	67	0,0250	1,25	480	1,47	60	105
18	0,1000	0,50	480	2,45	48	105	68	0,0250	0,50	480	2,45	60	10
19	0,1000	2,00	480	1,47	48	105	69	0,0250	2,00	480	0,49	60	105
20	0,0625	1,25	480	0,49	48	10	70	0,0625	2,00	480	2,45	60	105
21	0,1000	2,00	300	0,49	40	10	71	0,0625	1,25	480	1,47	60	200
22	0,1000	0,50	300	0,49	40	200	72	0,0625	2,00	480	1,47	60	10
23	0,1000	1,25	300	2,45	40	10	73	0,0625	0,50	480	0,49	60	105
24	0,1000	1,25	300	0,49	40	105	74	0,0250	0,50	480	0,49	60	10
25	0,1000	0,50	300	1,47	40	10	75	0,0250	2,00	480	2,45	60	10
26	0,0250	0,50	300	2,45	40	200	76	0,0250	2,00	480	0,49	60	200
27	0,0250	1,25	300	1,47	40	105	77	0,1000	2,00	480	2,45	60	200
28	0,0250	0,50	300	2,45	40	10	78	0,1000	0,50	480	2,45	60	105
29	0,0250	2,00	300	0,49	40	105	79	0,1000	2,00	480	1,47	60	105
30	0,0625	2,00	300	2,45	40	105	80	0,0625	1,25	480	0,49	60	10
31	0,0625	1,25	300	1,47	40	200	81	0,1000	2,00	350	0,49	54	10
32	0,0625	2,00	300	1,47	40	10	82	0,1000	0,50	350	0,49	54	200
33	0,0625	0,50	300	0,49	40	105	83	0,1000	1,25	350	2,45	54	10
34	0,0250	0,50	300	0,49	40	10	84	0,1000	1,25	350	0,49	54	105
35	0,0250	2,00	300	2,45	40	10	85	0,1000	0,50	350	1,47	54	10

N°	Ratio Enz. : Sub.	Ratio Tamp. : Tol.	Vitesse de rotation (rpm)	[Sub] _{toluène} (M)	T. (°C)	[Tamp.] (mM)	N°	Ratio Enz. : Sub.	Ratio Tamp. : Tol.	Vitesse de rotation (rpm)	[Sub] _{toluène} (M)	T. (°C)	[Tamp.] (mM)
36	0,0250	2,00	300	0,49	40	200	86	0,0250	0,50	350	2,45	54	200
37	0,1000	2,00	300	2,45	40	200	87	0,0250	1,25	350	1,47	54	105
38	0,1000	0,50	300	2,45	40	105	88	0,0250	0,50	350	2,45	54	10
39	0,1000	2,00	300	1,47	40	105	89	0,0250	2,00	350	0,49	54	105
40	0,0625	1,25	300	0,49	40	10	90	0,0625	2,00	350	2,45	54	105
41	0,1000	2,00	420	0,49	40	10	91	0,0625	1,25	350	1,47	54	200
42	0,1000	0,50	420	0,49	40	200	92	0,0625	2,00	350	1,47	54	10
43	0,1000	1,25	420	2,45	40	10	93	0,0625	0,50	350	0,49	54	105
44	0,1000	1,25	420	0,49	40	105	94	0,0250	0,50	350	0,49	54	10
45	0,1000	0,50	420	1,47	40	10	95	0,0250	2,00	350	2,45	54	10
46	0,0250	0,50	420	2,45	40	200	96	0,0250	2,00	350	0,49	54	200
47	0,0250	1,25	420	1,47	40	105	97	0,1000	2,00	350	2,45	54	200
48	0,0250	0,50	420	2,45	40	10	98	0,1000	0,50	350	2,45	54	105
49	0,0250	2,00	420	0,49	40	105	99	0,1000	2,00	350	1,47	54	105
50	0,0625	2,00	420	2,45	40	105	100	0,0625	1,25	350	0,49	54	10

Les essais sont réalisés dans un multi-réacteur par séquences de 20 tubes. Dans un tube de 30mL, l'enzyme, le tampon et la solution de monomère dans le toluène sont mélangés. Le tube est recouvert d'un septum, puis placé dans le multi-réacteur. Au bout de 72h, la réaction est stoppée par l'ajout de 5mL d'acétone. Le mélange est centrifugé pendant 3 min à 14 000 rpm pour séparer l'enzyme du reste des composés. Le mélange est ensuite extrait avec du chloroforme, puis la phase organique est lavée par de l'eau et de la saumure. La phase organique est récupérée et séchée sur MgSO₄. Enfin, le chloroforme est éliminé par évaporation rotative sous pression réduite. Les tubes sont traités dans un ordre aléatoire, ceux qui ne peuvent pas être traités dans la journée sont congelés.

Les résultats obtenus après analyse par RMN ¹H et SEC sont compilés dans le Tableau 12 :

Tableau 12 : Résultats du plan d'expérience

N°	Y1 : Taux de conversion	Y2 : Taux d'hydrolyse	Y3 : \overline{M}_w (g/mol)	Y4 : Đ	N°	Y1 : Taux de conversion	Y2 : Taux d'hydrolyse	Y3 : \overline{M}_w (g/mol)	Y4 : Đ
1	93%	11%	500	1,57	51	73%	5%	900	1,42
2	100%	20%	500	1,49	52	21%	6%	13 50	1,38
3	85%	21%	500	1,62	53	9%	14%	950	1,36
4	100%	6%	350	1,35	54	3%	22%	3 650	1,33
5	66%	19%	1 550	1,39	55	18%	5%	1 850	1,40
6	80%	12%	1 200	1,48	56	95%	14%	550	1,29
7	94%	16%	500	1,67	57	83%	5%	900	1,41
8	46%	5%	1 700	1,38	58	40%	6%	1 600	1,37
9	100%	20%	300	1,36	59	72%	8%	850	1,39
10	98%	19%	750	1,51	60	16%	16%	1 050	1,34
11	100%	22%	1 000	1,41	61	100%	13%	650	1,36
12	46%	16%	950	1,39	62	100%	6%	600	1,33

N°	Y1 : Taux de conversion	Y2 : Taux d'hydrolyse	Y3 : \overline{M}_w (g/mol)	Y4 : \overline{D}	N°	Y1 : Taux de conversion	Y2 : Taux d'hydrolyse	Y3 : \overline{M}_w (g/mol)	Y4 : \overline{D}
13	100%	23%	350	1,55	63	100%	15%	1 350	1,64
14	16%	15%	500	1,26	64	100%	7%	550	1,32
15	44%	21%	950	1,38	65	100%	13%	1 700	1,40
16	100%	18%	500	1,21	66	100%	8%	1350	1,56
17	100%	24%	950	1,22	67	100%	5%	750	1,42
18	96%	14%	1 600	1,33	68	90%	4%	2 100	1,38
19	100%	26%	900	1,21	69	100%	4%	550	1,25
20	46%	28%	900	1,22	70	100%	6%	950	1,47
21	36%	10%	750	1,44	71	100%	19%	800	1,40
22	86%	13%	800	1,37	72	100%	12%	1 100	1,55
23	38%	5%	1 400	1,35	73	84%	6%	2 650	1,15
24	79%	6%	650	1,32	74	53%	11%	700	1,46
25	31%	5%	1 250	1,31	75	94%	23%	1 400	1,30
26	36%	5%	1 350	1,33	76	100%	18%	500	1,26
27	38%	6%	950	1,35	77	100%	9%	800	1,46
28	16%	9%	2 100	1,41	78	100%	9%	1 450	1,42
29	87%	12%	550	1,31	79	100%	16%	750	1,43
30	63%	7%	950	1,42	80	100%	18%	700	1,43
31	83%	9%	900	1,40	81	100%	13%	700	1,38
32	25%	9%	1 300	1,37	82	100%	10%	650	1,37
33	20%	15%	800	1,37	83	98%	15%	1 350	1,58
34	5%	43%	1 550	1,30	84	100%	15%	600	1,30
35	14%	16%	1 350	1,34	85	90%	7%	1 150	1,54
36	98%	9%	600	1,30	86	91%	9%	1 650	1,42
37	91%	9%	900	1,42	87	100%	14%	950	1,41
38	56%	5%	1 450	1,36	88	71%	11%	2 400	1,39
39	73%	9%	800	1,40	89	100%	3%	550	1,29
40	20%	10%	950	1,37	90	100%	19%	950	1,46
41	31%	8%	950	1,26	91	100%	16%	800	1,40
42	14%	19%	550	1,30	92	95%	16%	1 050	1,51
43	39%	5%	1 350	1,36	93	100%	8%	850	1,44
44	74%	7%	650	1,35	94	40%	6%	850	1,38
45	29%	6%	1 350	1,37	95	73%	6%	1 450	1,37
46	41%	6%	1 500	1,36	96	100%	8%	550	1,26
47	35%	9%	1 000	1,36	97	100%	15%	900	1,40
48	20%	12%	1 950	1,36	98	99%	5%	1 600	1,39
49	83%	13%	600	1,31	99	100%	13%	850	1,39
50	56%	9%	950	1,41	100	94%	19%	850	1,40

Les résultats des essais 12, 33 et 73 ont été supprimés car des erreurs de manipulation ont été commises.

7. Détermination des coefficients et visualisations graphiques

Les résultats obtenus (les vecteurs Y1, Y2, Y3 et Y4) permettent de déterminer les différents coefficients du modèle mathématique par calcul matriciel. La valeur du coefficient correspond à l'effet de ce facteur sur la réponse : plus sa valeur absolue est élevée, plus il a d'influence. La valeur du coefficient est comparée à l'erreur liée à la variabilité du système

pour connaître sa significativité. Si l'effet d'un facteur est inférieur à l'erreur, alors celui-ci n'est pas significatif.

Les modèles obtenus pour chaque réponse sont explicités par l'Équation 2, seuls les effets des facteurs significatifs étant présentés.

Équation 2 : Equations des différentes réponses

- 1) $Y1(X1, X2, X4, X5, X6) = 93\% + 8\%X1 + 9\%X2 + 24\%X5 - 15\% X5^2 + 16\%X6 - 9\%X6^2 - 7\%X2X4$
- 2) $Y2(X2, X3, X4, X5) = 13\% + 4\%X3^2 - 2\%X4 - 5\% X5^2 + 2\%X2X4$
- 3) $Y3(X1, X2, X3, X4, X5, X6) = 909 - 90X1 - 230X2 + 168 X2^2 - 223 X3^2 + 278X4 + 217 X5^2 - 220X6$
- 4) $Y4(X1, X4, X5) = 1,42 - 0,04 X1^2 + 0,03X4 + 0,03X5$

Pour obtenir ces modèles (Équation 2), il a fallu dans un premier temps déterminer les différents coefficients du modèle mathématique ainsi que leurs intervalles de confiance (Figure 17). L'intervalle de confiance dépend directement de la valeur du coefficient et de l'erreur globale (erreur expérimentale, erreur liée à la régression linéaire). Si l'intervalle de confiance comprend la valeur zéro, alors le coefficient peut être nul et donc le facteur n'est pas significatif. Cette analyse, dite globale, permet de déterminer les valeurs des différents coefficients ainsi que leur significativité.

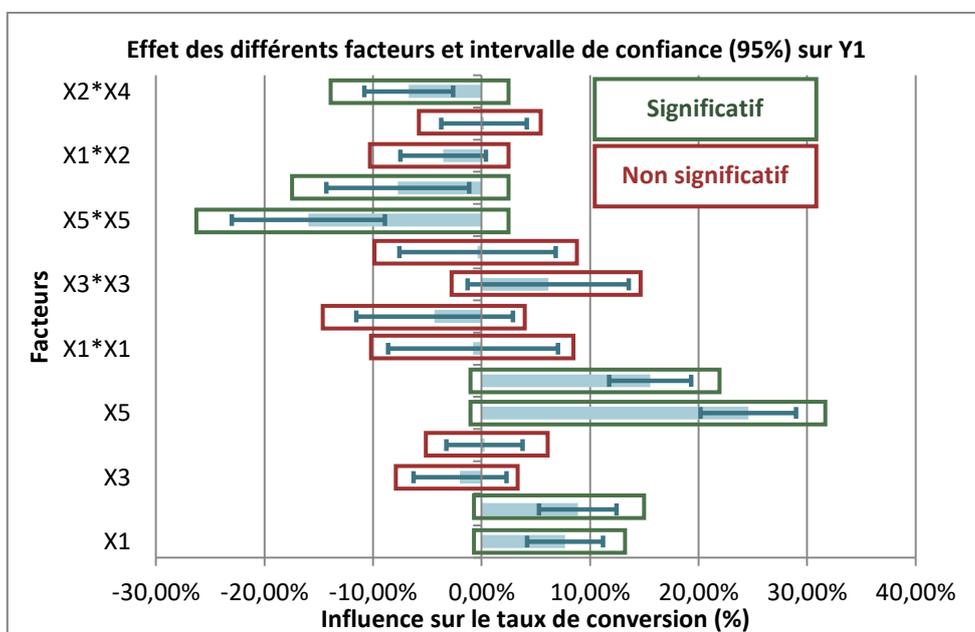


Figure 17 : Diagramme des effets des différents facteurs et intervalle de confiance (95%) sur Y1 après analyse globale

A la suite de cette analyse, les facteurs jugés non significatifs sont éliminés du modèle. Les coefficients et leur intervalle de confiance sont recalculés. Cette opération est répétée

jusqu'à ce que ne restent que les paramètres significatifs. Cette méthode, dite de réduction des variables, permet, en éliminant les variables non significatives, de mieux définir l'erreur en augmentant le degré de liberté.

Une fois les effets non significatifs éliminés, le diagramme pour le taux de conversion (Y1) devient alors le suivant (Figure 18) :

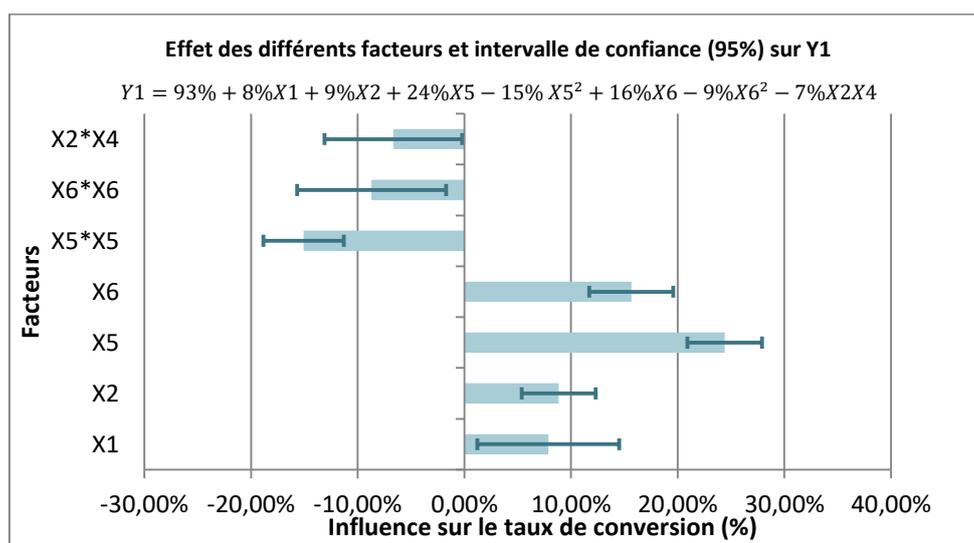


Figure 18 : Diagramme des effets des différents facteurs et intervalle de confiance (95%) sur Y1 après réduction des variables non significatives

Ce graphe permet de visualiser quel facteur est significatif et dans quelle mesure. Comme le montre la Figure 18, le facteur X5 est le plus significatif et son intervalle de confiance est restreint. Par contre, l'interaction des facteurs X2 et X4 est à la limite de significativité puisque son intervalle de confiance contient presque la valeur zéro. Par conséquent, pour moduler la réponse Y1, le facteur X5 est à modifier en priorité.

Les diagrammes pour les autres réponses sont donnés par la Figure 19:

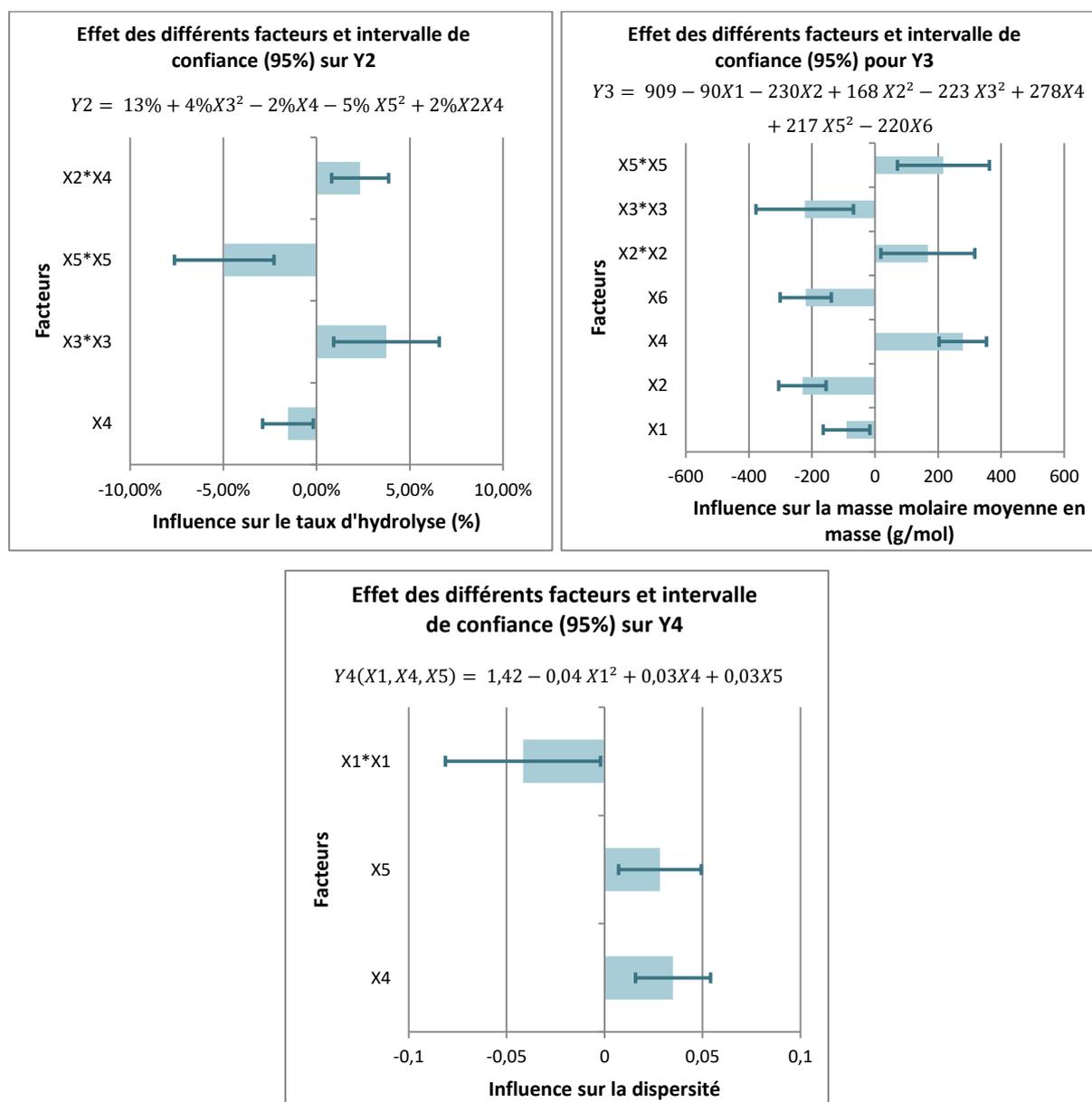


Figure 19 : Diagramme des effets des différents facteurs et intervalles de confiance (95%) pour Y2, Y3 et Y4

Le taux d'hydrolyse (Y2) dépend de quatre facteurs différents, X2, X3, X4 et X5. Il est donc possible de moduler le taux d'hydrolyse en faisant varier ces quatre paramètres. La variation la plus importante est observée lorsque le paramètre X5 varie.

La masse molaire moyenne en masse des polymères (Y3) dépend de tous les facteurs sélectionnés. Les paramètres X4, X6 et X2 sont les plus influents pour moduler cette réponse.

La dispersité (Y4) dépend de trois paramètres X1, X4 et X5. Le paramètre X1 est celui qui a le plus d'influence sur cette réponse.

Les diagrammes des effets principaux moyens sont une autre manière de visualiser les effets des facteurs significatifs. Plus un effet est significatif, plus la différence entre la valeur de la réponse au niveau -1 et celle de la réponse au niveau +1, est grande.

La Figure 20 donne, pour la réponse Y1, les diagrammes des effets principaux moyens :

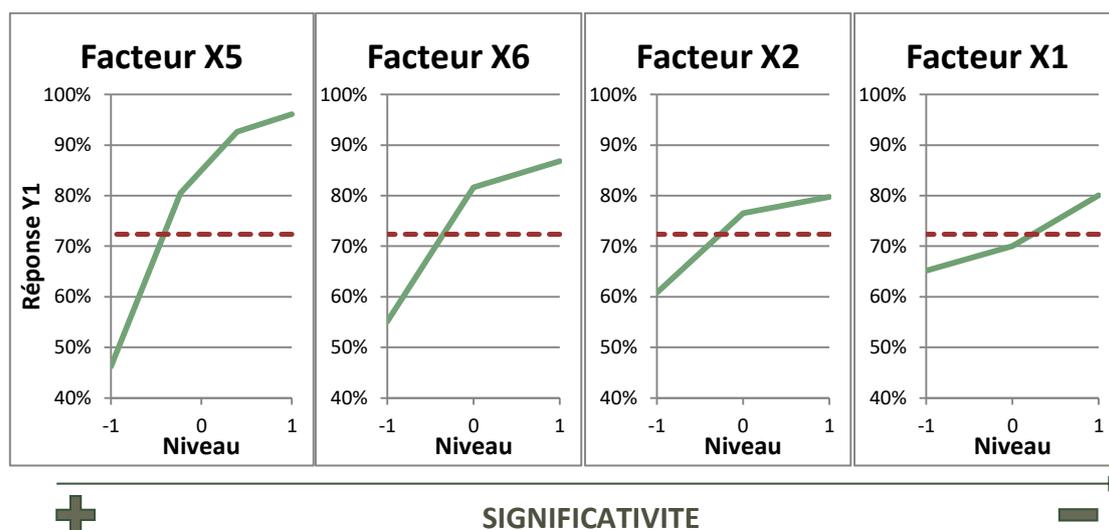


Figure 20 : Diagramme des effets principaux moyens pour Y1

Les points situés sur la ligne verte sont déterminés en calculant la moyenne des réponses lorsque le facteur est à un niveau donné. Par exemple, la valeur au point -1 du facteur X5 correspond à la moyenne des réponses d'Y1 lorsque le facteur X5 est au niveau -1.

La ligne en pointillés rouge correspond à la moyenne de l'ensemble des réponses.

Les facteurs X5 et X6 sont ceux dont l'influence est la plus notable, comme observé sur le diagramme des effets du taux d'hydrolyse (Figure 18).

A partir de l'Équation 2, il est également possible de tracer des surfaces de réponses (Figure 21 à Figure 24) en fonction de deux paramètres. Pour chaque réponse, les deux paramètres ayant le plus d'influence sont sélectionnés. Les paramètres moins influents restent fixés à une valeur optimale et la variation de la réponse est observée, sur l'axe vertical, en fonction des niveaux pris par les deux paramètres les plus influents.

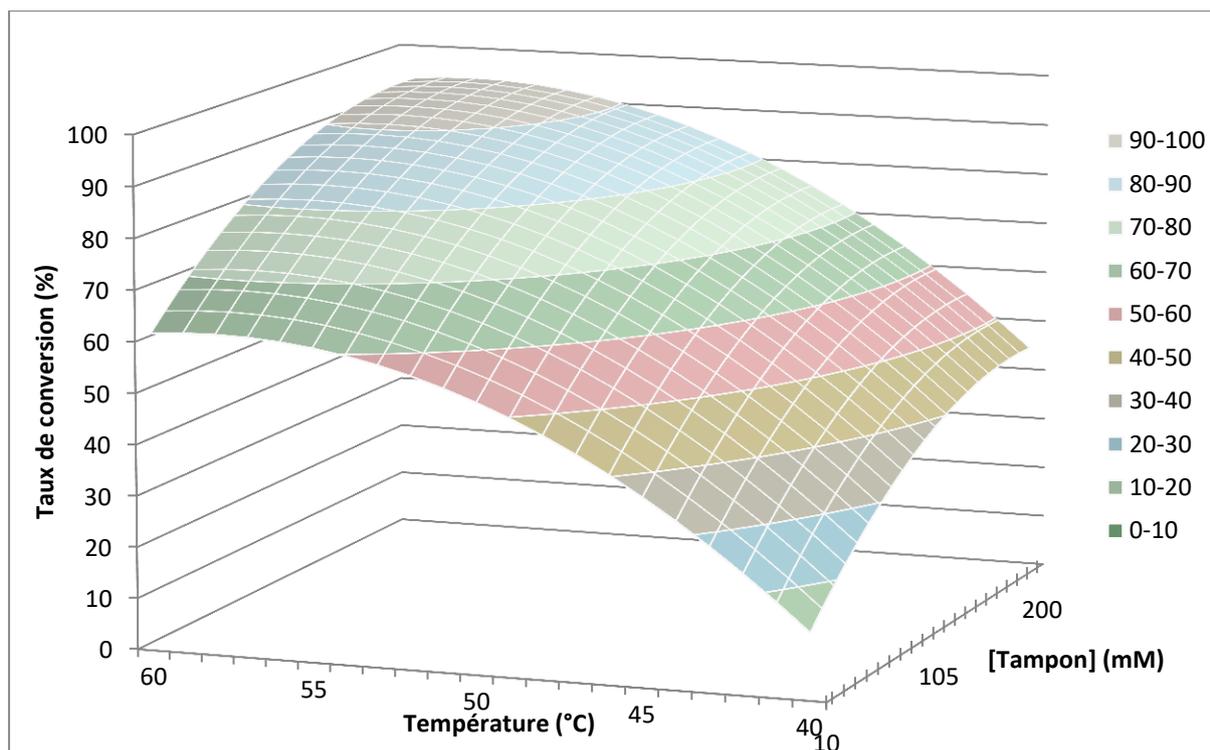


Figure 21 : Surface de réponse du taux de conversion en fonction de la température et de la concentration du tampon avec un ratio enzyme/lactone de 1/40, un ratio tampon/toluène de 1/2 et une concentration en lactone de 1,47 mol/L

La surface de réponse (Figure 21) précédente permet de visualiser rapidement l'évolution du taux de conversion en fonction de la température de la réaction et de la concentration du tampon. Ainsi les taux de conversion les plus élevés (proche de 100%) sont observés lorsque la température est à 60°C et la concentration en tampon de 200 mM. Il semble en effet logique que la conversion du MLABe soit meilleure lorsque la température est élevée. La concentration en tampon peut influencer l'activité de l'enzyme selon le type de tampon et d'enzyme utilisés. Dans ce cas précis, le taux de conversion est meilleur lorsque la concentration en Tris/HCl est élevée. En moyenne le taux de conversion est de 55 % lorsque la concentration est de 10 mM contre 82 % à 105 mM et 87 % à 200 mM (Figure 20)

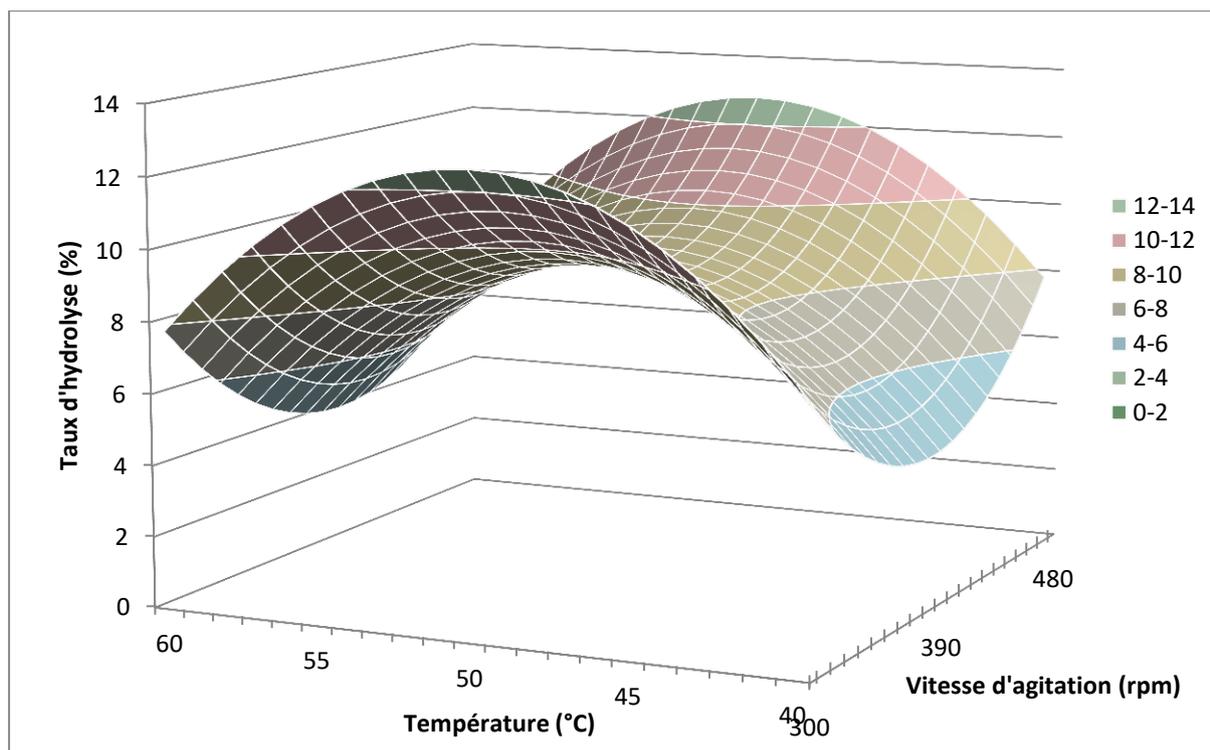


Figure 22 : Surface de réponse du taux d'hydrolyse en fonction de la température et de la vitesse d'agitation avec un ratio tampon/toluène de 1/2 et une concentration en lactone de 2,45 mol/L

L'interprétation de la Figure 22 est plus délicate. En effet, le taux d'hydrolyse est maximal lorsque la température est à 50 °C et plus faible à 40 et 60 °C. Notre hypothèse est qu'à 40 °C les réactions d'hydrolyse et de polymérisation sont toutes les deux lentes ce qui donne un taux d'hydrolyse faible. A 50 °C, les réactions d'hydrolyse et de polymérisation vont à des vitesses comparables et un taux d'hydrolyse relativement élevé en résulte. A 60 °C, la réaction de polymérisation est plus rapide que la réaction d'hydrolyse, conduisant à un taux d'hydrolyse faible. La vitesse de rotation a également une influence non linéaire sur le taux d'hydrolyse. Le taux d'hydrolyse est plus élevé à faible et forte agitation (300 et 480 rpm) et minimal à 390 rpm. Cela est vraisemblablement dû au mode d'agitation orbitaire, dont l'efficacité de mélange n'est pas toujours linéaire avec la vitesse de consigne.

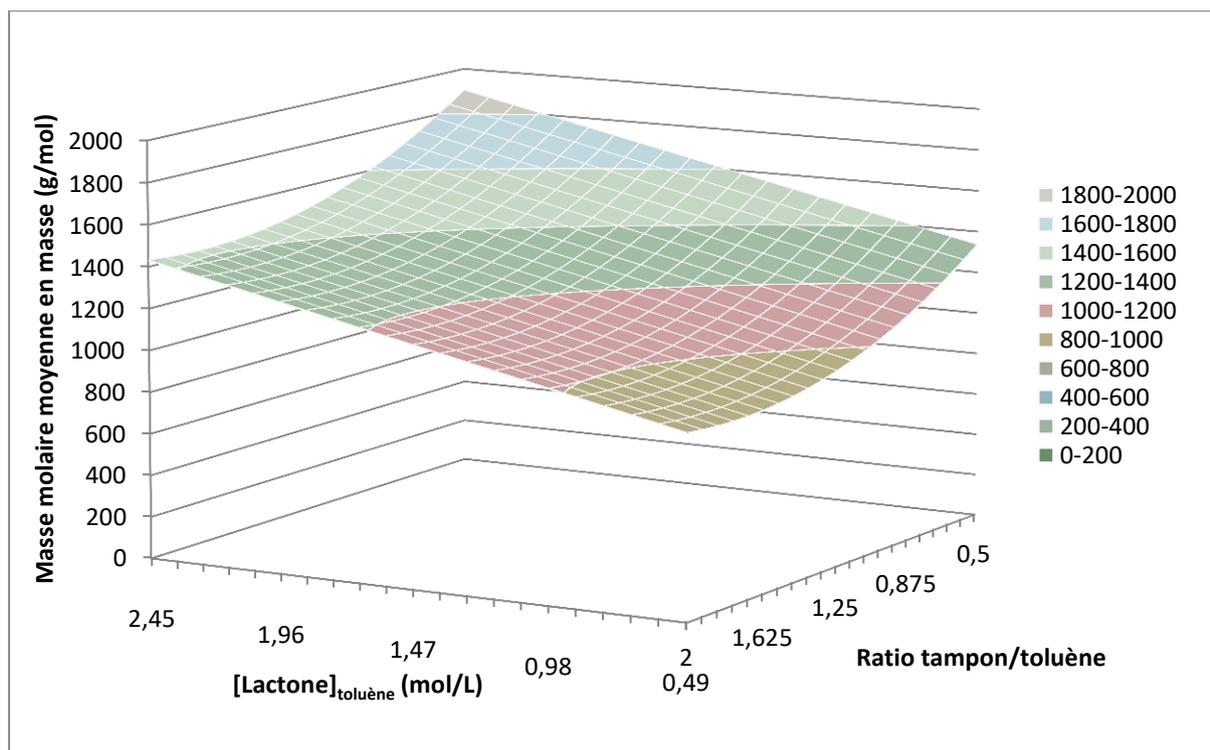


Figure 23 : Surface de réponse de la masse molaire moyenne en masse en fonction de la concentration en lactone et du ratio tampon/toluène avec un ratio enzyme/lactone de 1/40, une vitesse d'agitation de 390 rpm, une température de 60°C et une concentration en tampon de 105 mM

La Figure 23 montre que les masses molaires moyennes en masse des polymères sont plus élevées lorsque la concentration en MLABe dans le toluène est élevée et le ratio tampon/toluène faible. Ce fait concorde avec les PMLABe obtenus par polymérisation par voie chimique pour lesquels les masses molaires les plus élevées sont obtenues lorsque la réaction a lieu en masse (sans solvant). En effet, les réactions de transfert au solvant, qui parasitent la polymérisation et limitent les masses molaires des polymères, ne peuvent pas avoir lieu. L'inconvénient de cette méthode est que le transfert de masse est plus lent dans un milieu sans solvant, à cause d'une part de la viscosité du monomère puis de la prise en masse du milieu lors de la polymérisation.

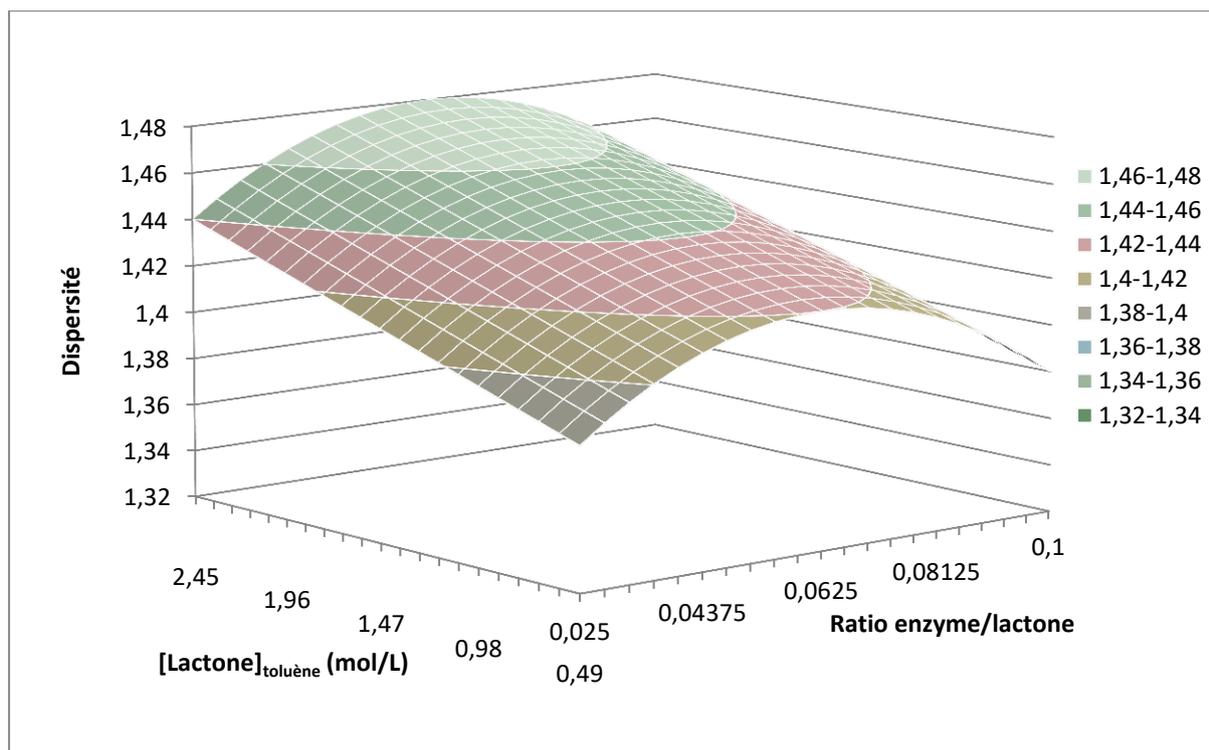


Figure 24 : Surface de réponse de la dispersité en fonction de la concentration en lactone et du ratio enzyme/lactone avec une température de 60°C

La dispersité des polymères est influencée par la concentration en MLABe dans le toluène et par le ratio PPL/MLABe. La dispersité est plus faible lorsque le MLABe est diluée dans le toluène (0,49 M). L'effet du ratio PPL/MLABe n'est pas linéaire puisque la dispersité est minimale (1,35) avec le ratio le plus faible et le plus fort (0,025 et 0,1). Cependant même les paramètres les plus influents ont peu d'importance car la dispersité varie très peu quelles que soit les conditions utilisées (1,35 à 1,5) et semble liée intrinsèquement à la polymérisation enzymatique.

8. Optimisation des paramètres

Selon les modèles obtenus, aucune valeur d'un paramètre ne permet d'optimiser les quatre réponses. Par exemple, la valeur de Y3 (masse molaire moyenne en masse) est maximale si le paramètre X6 (concentration du tampon) est égal à -1 et la valeur maximale de Y1 (conversion) ne peut être atteinte que si X6 a une valeur de 1. Ceci est, évidemment, impossible. Des choix et des compromis ont dû être faits afin d'obtenir des polymères ayant des masses molaires moyennes les plus élevées tout en ayant un taux de conversion supérieur à 70 %. Le compromis le plus intéressant donne une masse molaire moyenne en masse de 1 890 g/mol, un taux de conversion de 93 %, un taux d'hydrolyse de 4 % et une

dispersité de 1,4. Il correspond à un ratio enzyme/substrat de 1 : 40, un ratio tampon/toluène de 1 : 2, une agitation de 390 rpm, une concentration de lactone dans le toluène de 2,45 mol/L, une température de 60 °C et une concentration du tampon de 105 mM.

9. Validation du plan d'expérience

La combinaison jugée optimale, déterminée précédemment, ne figure pas dans les essais du plan initial. Pour valider le plan d'expérience, il est donc nécessaire d'essayer cette combinaison et de confronter le modèle prédictif du plan avec la réalité.

Dix essais ont été réalisés en utilisant les valeurs des paramètres optimisés, rappelés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Valeurs optimisées des différents paramètres

X	Nom du paramètre	Valeur optimisée
X1	Ratio enzyme/substrat	1 : 40
X2	Ratio tampon/toluène	1 : 2
X3	Vitesse de rotation	390 rpm
X4	Dilution : [Substrat] _{toluène}	2,45 M
X5	Température	60 °C
X6	Concentration du tampon	105 mM

Les résultats des analyses RMN ¹H et des SEC sont réunis dans le Tableau 14 :

Tableau 14: Résultats des essais avec les paramètres optimisés

Essai	Taux de conversion (%)	Taux d'hydrolyse (%)	\overline{M}_w (g/mol)	Đ
1	93%	3%	2300	1,45
2	94%	7%	1950	1,38
3	94%	3%	2800	1,42
4	95%	3%	2150	1,41
5	96%	4%	2150	1,43
6	96%	3%	2250	1,52
7	96%	2%	2450	1,42
8	95%	4%	2150	1,48
9	95%	3%	2400	1,47
10	93%	2%	1950	1,51

Le Tableau 15 compare les valeurs moyennes des résultats expérimentaux avec les valeurs prédites par le plan d'expérience.

Tableau 15 : Comparaison des valeurs prédites par le plan et celle obtenues expérimentalement

	Valeurs prédites par le plan d'expérience	Valeurs expérimentales
Taux de conversion (%)	93 ± 12	95 ± 1
Taux d'hydrolyse (%)	4 ± 4	3 ± 1
\overline{M}_w (g/mol)	1 900 ± 300	2 250 ± 250
\overline{D}	1,45 ± 0,06	1,45 ± 0,04

Les valeurs expérimentales obtenues sont très proches de celles prédites par le plan d'expérience comme le montre la Figure 25.

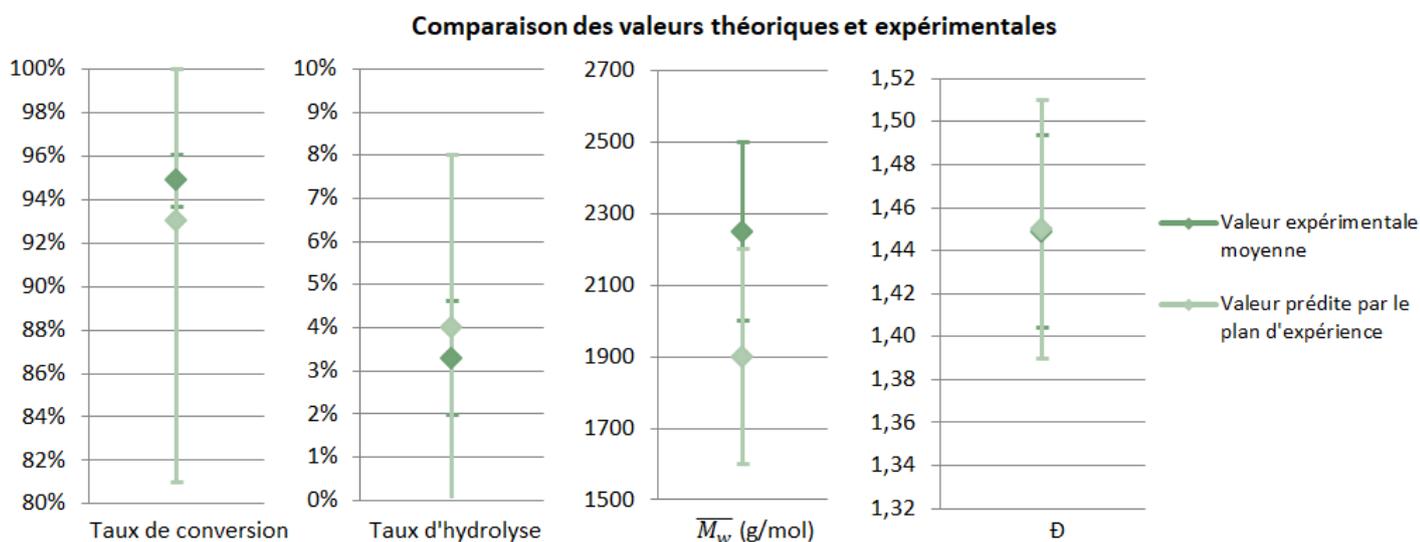


Figure 25 : Comparaison des valeurs théoriques et expérimentales

Le caractère prédictif du plan est donc démontré. Toutefois, les masses molaires moyennes en masse des polymères obtenus ne correspondent pas encore à nos besoins qui sont de 5 000 g/mol. L'objectif principal du plan n'est donc pas atteint. Cependant, il est toujours possible de les améliorer en réalisant une extrapolation.

10. Extrapolation

Il s'avère intéressant d'extrapoler, dans la mesure du possible, le plan d'expérience élaboré au-delà des bornes de celui-ci. Par exemple, les résultats, montrent qu'en concentrant le monomère dans la phase organique (Facteur X4 du plan d'expérience), les polymères ont des masses molaires moyennes en masse plus élevées (Réponse Y3 du plan d'expérience) (voir Équation 2 ou Figure 23). Dans le plan d'expérience la concentration maximale de monomère dans le toluène était de 2,45 mol/L. Par conséquent, nous avons décidé de

réaliser la réaction en l'absence de solvant organique, les autres paramètres restant à leurs valeurs optimisées : un ratio enzyme/substrat de 1 : 40, un ratio phase aqueuse (tampon)/ phase organique (MLABe pur) de 1 : 2, une agitation de 390 rpm, une température de 60 °C et une concentration du tampon de 105 mM.

Le Tableau 16 regroupe les résultats obtenus sur les sept essais:

Tableau 16 : Résultats des polymérisations en l'absence de solvant organique

	Taux de conversion	Taux d'hydrolyse	\overline{M}_w (g/mol)	\overline{D}
Essai 1	96%	3%	5 050	1,65
Essai 2	97%	4%	4 100	1,61
Essai 3	82%	1%	11 050	1,78
Essai 4	92%	1%	8 200	1,72
Essai 5	71%	0%	7 000	1,51
Essai 6	59%	0%	6 800	1,63
Essai 7	76%	0%	6 300	1,59

Les polymères obtenus ont des masses molaires supérieures à celles obtenus jusqu'à maintenant et six des sept essais ont donné des polymères répondant au critère de masse molaire édicté au début du chapitre (supérieure à 5 000 g/mol). L'extrapolation du plan d'expérience a donc rempli son principal objectif. Toutefois, les dispersités mesurées sont plus élevées ($\approx 1,7$) que celle obtenues précédemment et la reproductibilité est faible (30 % d'écart-type sur les masses molaires). La non-utilisation de solvant organique a permis d'augmenter les masses molaires mais a rendu difficile les transferts de matières. Le milieu réactionnel prend en masse plus rapidement et l'accès aux polymères en croissance est moins aisé, de nouveaux oligomères peuvent alors apparaître. La précipitation fractionnée permet de séparer de manière sélective les polymères ayant une masse molaire élevée des petits oligomères. Les polymères ont donc été purifiés par cette méthode, en ajoutant goutte à goutte une solution concentrée de polymères dans du chloroforme dans un large excès d'éther diéthylique froid.

Les résultats après précipitations obtenus sont présentés dans le Tableau 17 :

Tableau 17 : Masses molaires et dispersité des polymères après précipitation

	M_w (g/mol)	D
Essai 1	5 900	1,47
Essai 2	5 100	1,48
Essai 3	12 250	1,40
Essai 4	13 350	1,57
Essai 5	7 950	1,50
Essai 6	7 750	1,41
Essai 7	8 350	1,25

La précipitation fractionnée a correctement fonctionné sur les polymères puisque la dispersité a diminué de 14 % en moyenne.

Cette méthode de polymérisation enzymatique en l'absence de toluène, en plus de conduire à des polymères ayant des masses molaires moyennes très convenables, permet de s'affranchir de l'utilisation de solvant organique, ce qui est indéniablement un point extrêmement positif tant sur le plan économique qu'écologique (diminution des déchets, solvants organiques toxiques).

11. Conclusions

Les objectifs fixés au départ du plan d'expérience ont été réalisés grâce à son extrapolation.

Des polymères ayant des masses molaires supérieures à 5 000 g/mol ont été obtenus (8 650 g/mol \pm 3 050) avec un taux de conversion supérieur à 80 % (82 % \pm 14 %), un taux d'hydrolyse inférieur à 5 % (1 % \pm 1%) et une dispersité inférieure à 1,4 (1,4 \pm 0,1).

De plus, la validation du plan d'expérience a permis de tester la robustesse de ses prédictions. Il nous offre la possibilité de synthétiser, de manière contrôlée, des polymères (oligomères) ayant des masses molaires comprises entre 400 et 2 000 g/mol.

Pour l'instant, une seule enzyme a été utilisée, la lipase du pancréas de porc et un seul tampon, le tampon Tris/HCl. La nature de ces deux paramètres pouvant influencer grandement la polymérisation, des criblages ont été réalisés.

III. Criblage des tampons

Le but de ce criblage est d'étudier l'influence de la nature du tampon sur la polymérisation et les caractéristiques des polymères obtenus. Jusqu'à présent le tampon utilisé est le

Tris/HCl à pH=7. Or, les tampons phosphates semblent plus utilisés dans la littérature pour les réactions avec des lipases^{16,17}. Trois tampons différents ont été testés en fixant la valeur du pH à 7: le Tris/HCl comme référence et deux tampons phosphate, de potassium et de sodium, pour évaluer également l'influence des contre ions spectateurs. Un autre essai a été mené avec de l'eau distillée ($H_2O_{\text{dist.}}$) à la place du tampon.

Les essais sont réalisés dans un multi-réacteur en triplicata. Dans un tube de 30mL, l'enzyme (8,4 mg), la solution de MLABe dans le toluène (667 μL , 2,44 mol/L) et le tampon (337 μL , 105 mM, pH 7) ou l'eau distillée sont mélangés. Au bout de 72h à 60 °C et 390 rpm, la réaction est stoppée et le polymère purifié comme décrit précédemment.

Le Tableau 18 présente les résultats des analyses RMN et SEC effectuées :

Tableau 18 : Résultats de l'étude sur l'influence de la nature du tampon

Tampon	Taux de conversion		Taux d'hydrolyse		\overline{M}_w (g/mol)		\overline{D}	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Tris/HCl	96%	3%	5%	1%	1 500	100	1,37	0,06
$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$	94%	5%	11%	7%	1 600	300	1,43	0,08
$\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$	88%	18%	7%	4%	1 450	350	1,39	0,02
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dist.}}$	85%	9%	7%	5%	1 650	100	1,40	0,05

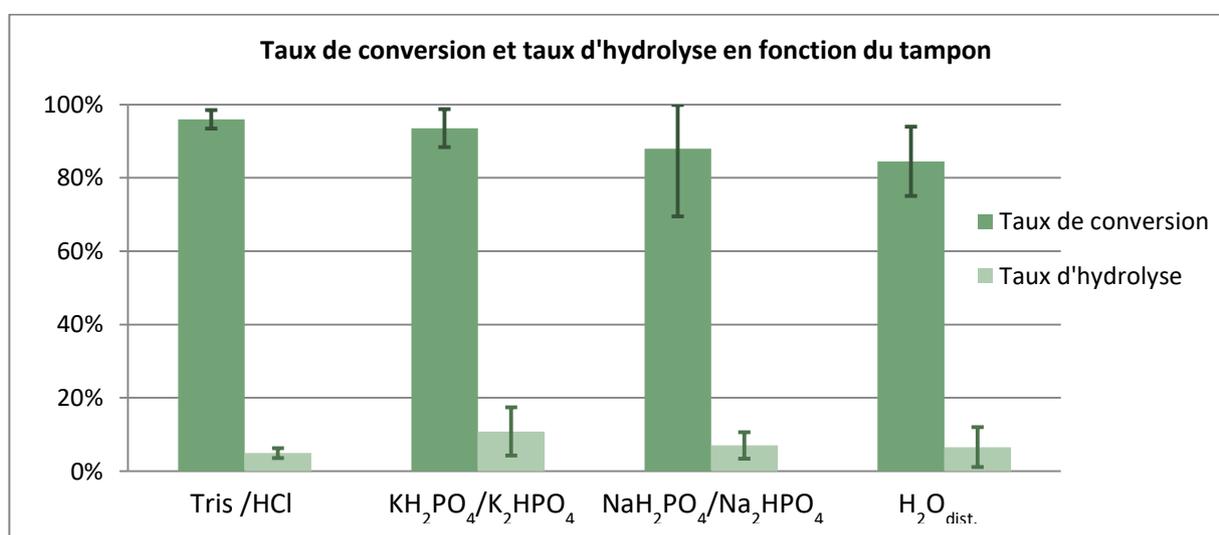


Figure 26 : Comparaison des taux de conversion et des taux d'hydrolyse en fonction du tampon

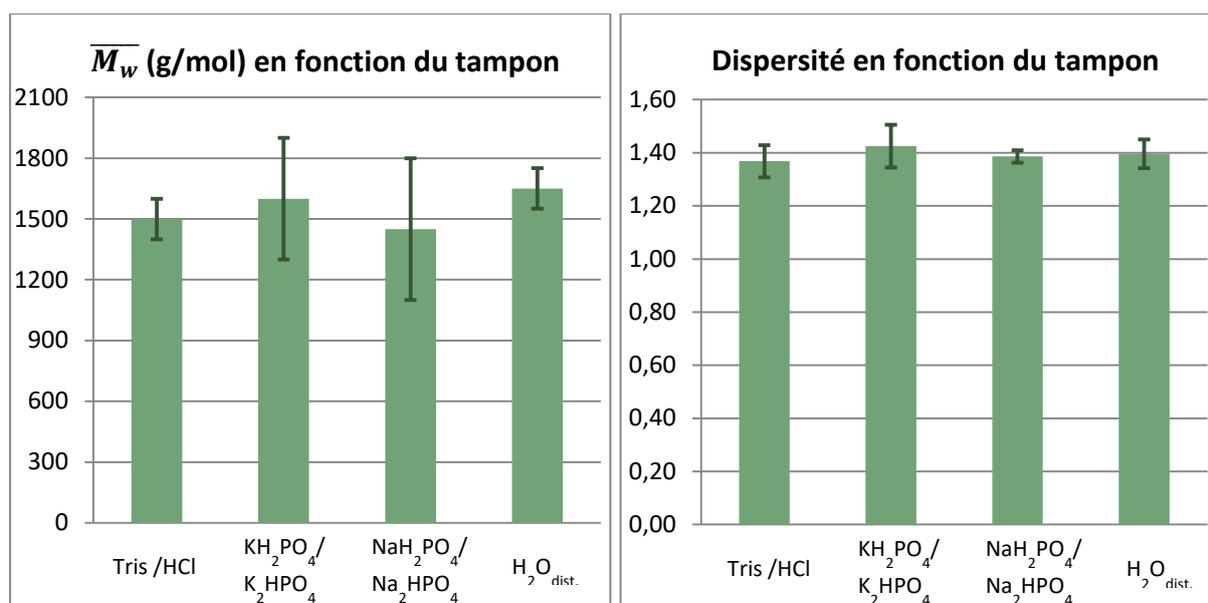


Figure 27 : Comparaison des masses molaires moyenne en masse et de la dispersité des polymères obtenus en fonction du tampon

Il est difficile de faire ressortir un tampon de ces expériences. En effet, l'enzyme semble réagir de façon assez similaire quel que soit le tampon. D'un point de vue statistique, les écarts observés ne sont pas significatifs (Figure 26 et Figure 27) le tampon Tris/HCl est donc un tampon adapté à notre réaction et il continuera d'être utilisé.

IV. Criblage des enzymes

Les différentes réactions présentées jusque-là ont toutes été réalisées en utilisant la lipase issue du pancréas de porc. Cette lipase avait été choisie dans un premier temps par soucis de commodité puisqu'elle était présente en grande quantité au laboratoire. Les lipases étant des enzymes présentes dans l'ensemble du vivant, il est probable que d'autres lipases issues d'autres organismes aient une meilleure réactivité avec le MLABe.

Un criblage de 16 enzymes (15 lipases et 1 estérase) différentes a été mis en place pour détecter celles ayant les meilleures activités avec le MLABe, celles-ci sont présentées dans la Figure 28.



Figure 28 : Présentation des enzymes criblées

Un test d'activité enzymatique a tout d'abord été réalisé afin de standardiser la quantité d'enzyme à utiliser en fonction de sa nature. Le test retenu est le suivi cinétique de l'hydrolyse du *p*-nitrophényl butyrate (*p*-NPB) en *p*-nitrophénol (*p*-NP), par mesure de l'absorbance à 405nm (Schéma 2)

Le *p*-NPB a été choisi pour deux raisons, sa chaîne carbonée contient quatre atomes de carbone, limite basse pour être considérée comme une chaîne grasse et il est disponible commercialement.

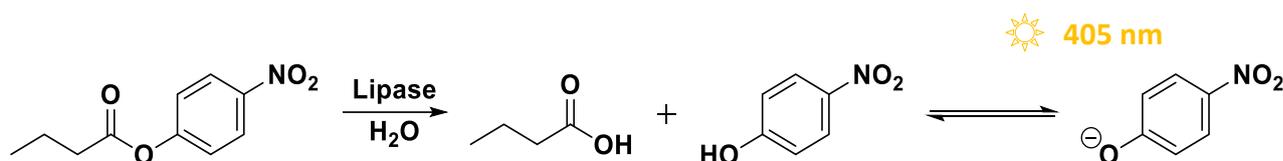
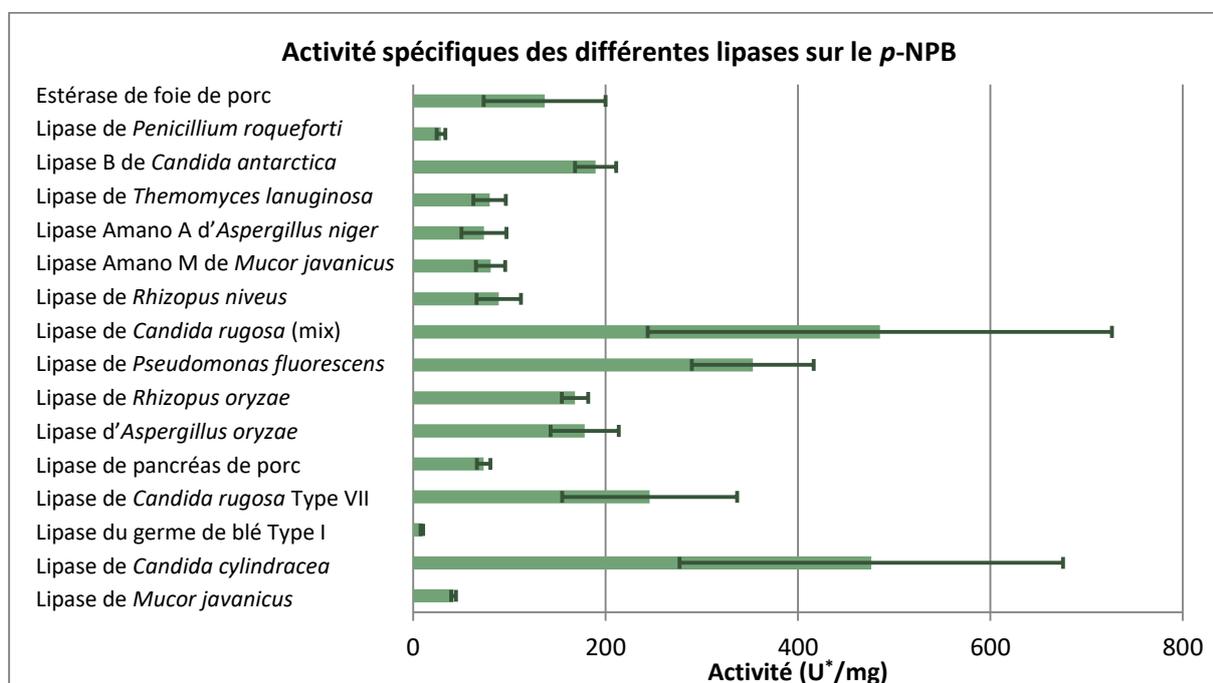


Schéma 2 : Réaction d'hydrolyse enzymatique du *p*-NPB en *p*-NP

Dans une microplaque 96 puits, du tampon potassium phosphate (pH 7,2, 100 mM), la solution enzymatique et le *p*-NPB (40 mM dans du *tert*-amyl alcool) sont mélangés. L'ajout du *p*-NPB initie la réaction, l'absorbance est alors mesurée à 405 nm pendant 10 min.

Les activités spécifiques sont compilées dans la Figure 29 :



U : unité enzymatique correspond à des μmol de *p*-NP formés par min

Figure 29 : Activités enzymatiques des différentes lipases sur le *p*-NPB

Ce test reste pertinent même si l'activité des enzymes est dépendante du substrat utilisé car il permet de connaître l'activité de toutes les enzymes choisies sur un même substrat. Il permet de normaliser le nombre d'unité enzymatique mis en jeu dans la réaction de polymérisation. Ainsi, une masse plus faible sera ajoutée pour les enzymes ayant une activité spécifique forte et inversement.

La masse de lipase de pancréas de porc utilisé lors des précédentes expériences de polymérisation enzymatique est de 0,025 mg/mg de MLABe. L'activité de cette enzyme est

de 73,4 U/mg, ce qui signifie que le nombre d'unité de référence est de 1,84 U/mg de MLABe. Les masses d'enzyme à ajouter ont donc été ajustées en fonction de leur activité pour correspondre à 1,84 U/mg de MLABe.

Les paramètres physico-chimiques de la polymérisation sont ceux déterminés précédemment lors de l'extrapolation du plan d'expérience, seule la masse d'enzyme varie en fonction de l'activité de l'enzyme.

Dans un tube de 30 mL, l'enzyme (masse en fonction de l'activité spécifique), le tampon Tris/HCl (124 µL, 105 mM, pH 7) et le MLABe (336 mg) sont mélangés. Au bout de 72h à 60 °C et 390 rpm, la réaction est stoppée et le polymère purifié comme décrit précédemment

Les résultats des taux de conversion et taux d'hydrolyse déterminés par RMN ¹H ainsi que les masses molaires moyennes en masse et la dispersité mesurées par SEC sont présentés dans les figures suivantes (Figure 30, Figure 31, Figure 32):

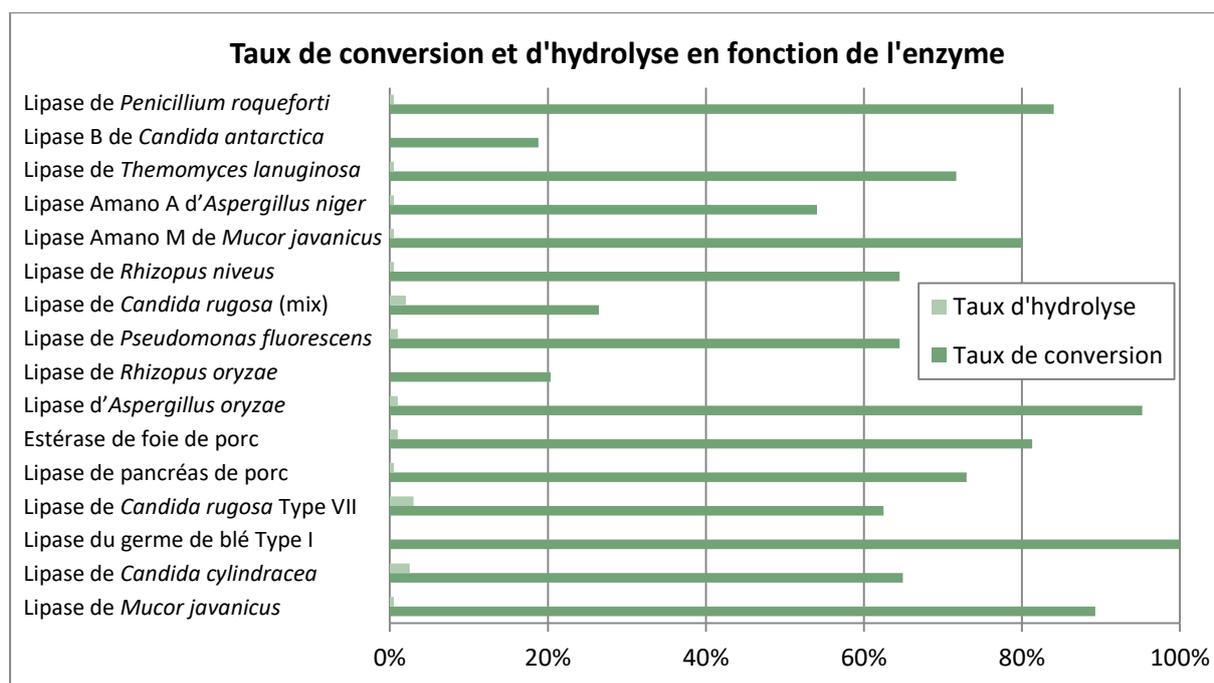


Figure 30 : Comparaison des taux de conversion et des taux d'hydrolyse en fonction de l'enzyme

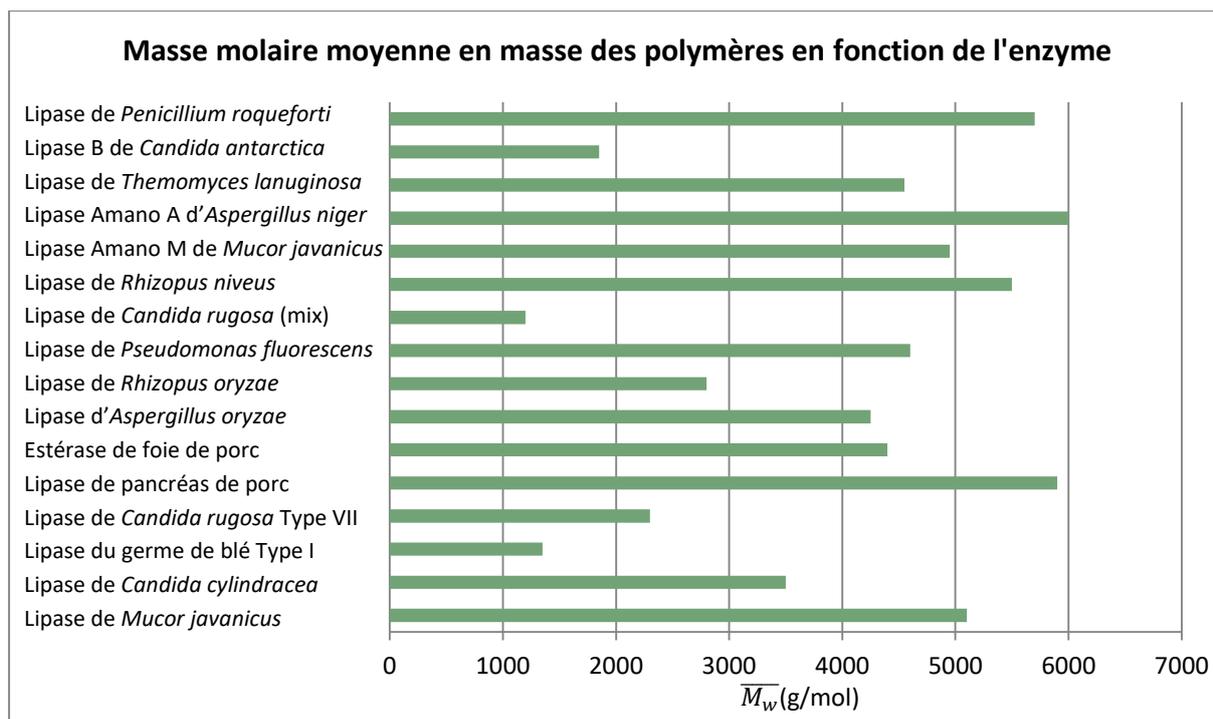


Figure 31 : Comparaison des masses molaires moyenne en masse des polymères obtenus en fonction de l'enzyme

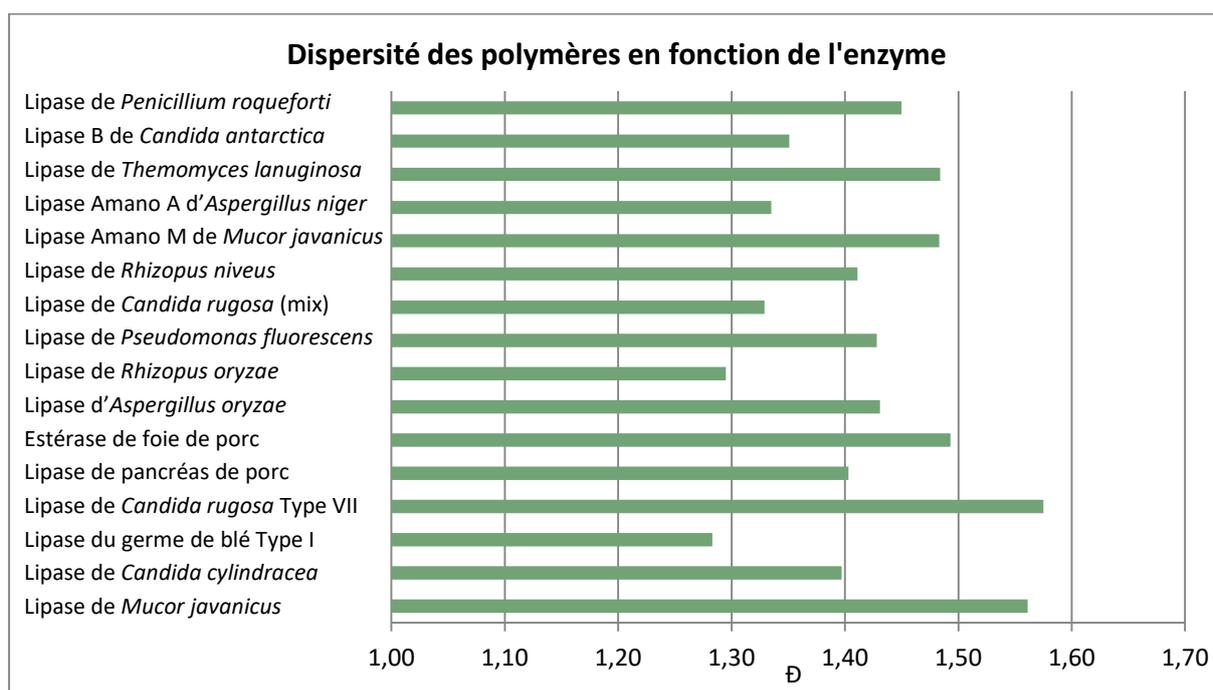


Figure 32 : Comparaison des dispersité des polymères obtenus en fonction de l'enzyme

La nature de l'enzyme joue un rôle primordial dans la polymérisation et sur les propriétés des polymères. En effet, selon l'enzyme utilisée la conversion au bout de 72 h varie de 19 % pour la lipase B de *Candida antarctica* à 100 % pour la lipase de germe de blé. La masse molaire moyenne en masse des polymères obtenus varie de 1 200 g/mol s'ils ont été

synthétisés avec la lipase de *Candida rugosa* (mix) à 6 000 g/mol en utilisant la lipase d'*Aspergillus niger*. Les écarts sur la dispersité sont moins importants mais des différences significatives sont observées avec, par exemple, une dispersité mesurée de 1,58 pour les polymères synthétisés avec la lipase issue de *Candida rugosa* (type VII) contre 1,28 avec la lipase du germe de blé. Le taux d'hydrolyse, par contre, ne semble pas influencé par la nature de l'enzyme avec des variations de 0 à 3 %.

Des résultats plutôt surprenants sont observés avec la lipase B de *Candida antarctica* qui est l'une des lipases les plus utilisées dans les réactions biocatalysées en général et de polymérisation en particulier^{18,19}. La faible conversion (19 %) après 72 h semble indiquer une très faible affinité avec le MLABe ou alors des conditions expérimentales peu adaptées à cette lipase.

Trois enzymes, offrant un bon compromis entre taux de conversion (X%), taux d'hydrolyse (H%), masse molaire moyenne en masse (\overline{M}_w) et dispersité (\mathcal{D}), ont été repérées grâce à ce criblage (Figure 33).

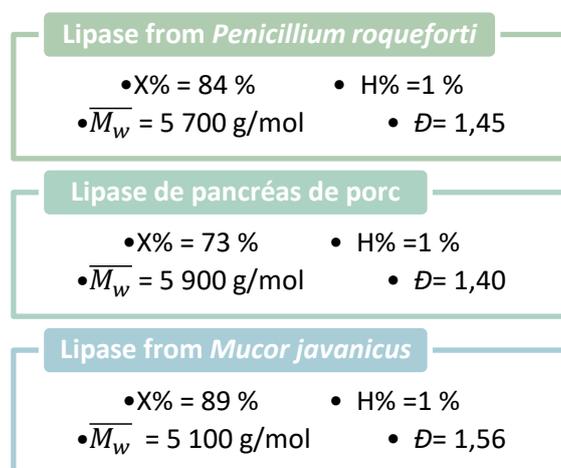


Figure 33 : Lipases criblées aux résultats les plus intéressants

Finalement, la lipase de pancréas de porc utilisée depuis le début présente des résultats très intéressants et son faible coût comparé aux deux autres enzymes nous conforte dans son utilisation.

Les polymères synthétisés lors du criblage enzymatique ont été caractérisés plus en détails. Après précipitation dans de l'éther froid, les polymères obtenus ont été analysés par calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Cette méthode d'analyse permet de déterminer

les propriétés thermiques des polymères comme la température de transition vitreuse (T_g) et une éventuelle température de fusion (T_f). L'analyse se déroule en deux parties, d'abord un premier passage ou scan est réalisé pour mesurer une température de fusion si elle existe. Une trempe est ensuite réalisée c'est-à-dire que le polymère est ensuite plongé dans de l'azote liquide pour figer le polymère en phase amorphe. Au deuxième passage, le polymère étant complètement amorphe la température de transition vitreuse est mesurée de façon plus précise.

Le Tableau 19 regroupe les résultats des analyses DSC ainsi que les analyses SEC des polymères précipités. Un (1) signifie que la valeur a été mesurée au premier scan et un (2) au deuxième scan.

Tableau 19 : Résultats des analyses DSC des polymères issus du criblage

Enzyme	\overline{M}_w (g/mol)	\overline{D}	T_g (°C)	T_f (°C)
Lipase de <i>Mucor javanicus</i>	5700	1,36	27 (2)	131 (1)
Lipase de <i>Candida cylindracea</i>	3890	1,46	21 (2)	131 (1)
Lipase de germe de blé Type I	1600	1,38	27 (2)	130 (1)
Lipase de <i>Candida rugosa</i> Type	3000	1,42	23 (2)	132 (1)
Lipase de <i>pancréas de porc</i>	6500	1,29	24 (2)	95 (1)
Lipase d' <i>Aspergillus oryzae</i>	5100	1,29	27 (2)	-
Estérase de foie de porc	5000	1,30	25 (2)	-
Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	4450	1,27	20 (2)	92 (1)
Lipase de <i>Pseudomonas</i>	5300	1,44	25 (2)	-
Lipase de <i>Candida rugosa</i> (mix)	2450	1,60	21 (2)	-
Lipase de <i>Rhizopus niveus</i>	6400	1,31	25 (2)	-
Lipase Amano M de <i>Mucor</i>	6300	1,29	24 (2)	-
Lipase Amano A d' <i>Aspergillus</i>	6800	1,22	26 (2)	97 (1)
Lipase de <i>Thermomyces</i>	5550	1,30	25 (2)	-
Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	5100	1,18	N.D.	N.D.
Lipase de <i>Penicillium roqueforti</i>	6350	1,29	29 (2)	-

Les températures de transition vitreuse mesurées sont proches les unes des autres quelle que soit l'enzyme utilisée durant la polymérisation. Les valeurs sont comprises entre 20 et 29 °C, valeurs similaires à la T_g pour un polymère synthétisé par voie chimique (amorcé avec du benzoate de tétraéthylamonium) qui est de 37 °C²⁰.

Par contre, aucun polymère synthétisé par voie chimique à partir de MLABe racémique ne présente de température de fusion, ce sont des polymères dit amorphes. Ici, sept des quinze polymères analysés ont une température de fusion, ce sont des polymères dit semi-cristallins. Ce résultat inattendu nous amène à nous interroger sur le rôle de l'enzyme et son action durant la polymérisation.

En effet, une température de fusion est l'indication d'une organisation tridimensionnelle particulière. Puisque cette organisation est observée uniquement lorsque la synthèse fait intervenir des enzymes, c'est donc que l'enzyme joue un rôle capital dans cette structuration. Afin d'éclaircir le mode d'action de l'enzyme, des études mécanistiques et cinétiques ont été réalisées. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre 2 de cette thèse.

Références bibliographiques

- (1) Matsumura, S. Enzymatic Synthesis of Polyesters via Ring-Opening Polymerization. In *Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers*; Kobayashi, S., Ritter, H., Kaplan, D., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2005; Vol. 194, pp 95–132.
- (2) Uyama, H.; Takeya, K.; Kobayashi, S. Synthesis of Polyesters by Enzymatic Ring-Opening Copolymerization Using Lipase Catalyst. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **1993**, *69* (8), 203–207 DOI: 10.2183/pjab.69.203.
- (3) Kikuchi, H.; Uyama, H.; Kobayashi, S. Lipase-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Substituted Lactones. *Polym. J.* **2002**, *34* (11), 835–840 DOI: 10.1295/polymj.34.835.
- (4) Matsumura, S.; Beppu, H.; Nakamura, K.; Osanai, S.; Toshima, K. Preparation of Poly(β -Malic Acid) by Enzymatic Ring-Opening Polymerization of Benzyl β -Malolactonate. *Chem. Lett.* **1996**, No. 9, 795–796 DOI: 10.1246/cl.1996.795.
- (5) Panova, A. A.; Taktak, S.; Randriamahefa, S.; Cammas-Marion, S.; Guerin, P.; Kaplan, D. L. Polymerization of Propyl Malolactonate in the Presence of *Candida Rugosa* Lipase. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (1), 19–27 DOI: 10.1021/bm0255746.
- (6) Casajus, H.; Tranchimand, S.; Wolbert, D.; Nugier-Chauvin, C.; Cammas-Marion, S. Optimization of Lipase-Catalyzed Polymerization of Benzyl Malolactonate through a Design of Experiment Approach. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134* (11) DOI: 10.1002/app.44604.
- (7) Schimmerling, P.; Sisson, J.-C.; Zaïdi, A. *Pratique des plans d'expériences*; Tec et doc-Lavoisier: Paris Londres New York, 1998.
- (8) Lohith, K.; Manohar, B.; Divakar, S. Influence of Buffer and L-Phenylalanine Concentration in the *Rhizomucor Miehei* Lipase Catalysed Synthesis of L-Phenylalanyl-D-Glucose Ester Investigated through Response Surface Methodology. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *224* (2), 219–224 DOI: 10.1007/s00217-006-0313-1.
- (9) Makareviciene, V.; Sinkuniene, D.; Sendzikiene, E. Optimisation of Enzymatic Transesterification of Linseed Oil and Pork Lard Mixture with Ethanol Using Response Surface Methodology. *J. Renew. Sustain. Energy* **2015**, *7* (5), 053119 DOI: 10.1063/1.4934589.
- (10) Shamel, M. m.; Hasan, M.; Ramachandran, K. b. Operational Stability of Lipase Enzyme: Effect of Temperature and Shear. *Dev. Chem. Eng. Miner. Process.* **2005**, *13* (5–6), 599–604 DOI: 10.1002/apj.5500130509.
- (11) Vicente, G.; Coteron, A.; Martinez, M.; Aracil, J. Application of the Factorial Design of Experiments and Response Surface Methodology to Optimize Biodiesel Production. *Ind. Crops Prod.* **1998**, *8* (1), 29–35 DOI: 10.1016/S0926-6690(97)10003-6.
- (12) Molina, R.; Martínez, F.; Melero, J. A.; Bremner, D. H.; Chakinala, A. G. Mineralization of Phenol by a Heterogeneous Ultrasound/Fe-SBA-15/H₂O₂ Process: Multivariate Study by Factorial Design of Experiments. *Appl. Catal. B Environ.* **2006**, *66* (3), 198–207 DOI: 10.1016/j.apcatb.2006.03.015.
- (13) Aslan, N.; Cebeci, Y. Application of Box–Behnken Design and Response Surface Methodology for Modeling of Some Turkish Coals. *Fuel* **2007**, *86* (1), 90–97 DOI: 10.1016/j.fuel.2006.06.010.
- (14) Annadurai, G.; Sheeja, R. Y. Use of Box-Behnken Design of Experiments for the Adsorption of Verofix Red Using Biopolymer. *Bioprocess Eng.* **1998**, *18* (6), 463–466 DOI: 10.1007/s004490050472.
- (15) El-Hagrasy, A. S.; D'Amico, F.; Drennen, J. K. A Process Analytical Technology Approach to Near-Infrared Process Control of Pharmaceutical Powder Blending. Part I: D-Optimal Design for Characterization of Powder Mixing and Preliminary Spectral Data Evaluation. *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95* (2), 392–406 DOI: 10.1002/jps.20467.
- (16) Bordes, F.; Cambon, E.; Dossat-Létisse, V.; André, I.; Croux, C.; Nicaud, J. M.; Marty, A. Improvement of *Yarrowia Lipolytica* Lipase Enantioselectivity by Using Mutagenesis Targeted to the Substrate Binding Site. *ChemBioChem* **2009**, *10* (10), 1705–1713 DOI: 10.1002/cbic.200900215.
- (17) Chen, C.-C.; Reddy, P. M.; Devi, C. S.; Chang, P.-C.; Ho, Y.-P. Study of Microwave Effects on the Lipase-Catalyzed Hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.* **2016**, *82*, 164–172 DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.10.003.
- (18) Montanier, C. Y.; Chabot, N.; Emond, S.; Guieysse, D.; Remaud-Siméon, M.; Peruch, F.; André, I. Engineering of *Candida Antarctica* Lipase B for Poly(ϵ -Caprolactone) Synthesis. *Eur. Polym. J.* **2017**, *95*, 809–819 DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2017.07.029.

- (19) Zhong, J.; Xu, F.; Wang, J.; Li, Y.; Lin, X.; Wu, Q. *Candida Antarctica* Lipase B-Catalyzed Synthesis of Polyesters: Starting from Ketones via a Tandem BVO/ROP Process. *RSC Adv.* **2014**, *4* (17), 8533–8540 DOI: 10.1039/C3RA47493C.
- (20) Cammas, S. *Le poly(acide β -malique) et ses dérivés: synthèse et caractérisation*, Université Paris VI: Paris, 1993.

Experimental Part Chapter 1

I. General conditions

1. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy

The standard temperature is adjusted to 298K.

NMR spectra are recorded on a Bruker Avance III 400 spectrometer operating at 400.13 MHz for ^1H , equipped with a BBFO probe with a Z-gradient coil and a GREAT 1/10 gradient unit.

The zg30 Bruker pulse program was used for 1D ^1H NMR, with a TD of 64k, a relaxation delay $d1 = 2\text{s}$ and 8 scans. The spectrum width was set to 18 ppm. Fourier transform of the acquired FID was performed without any apodization in most of the case.

2. Infrared spectroscopy

FT-IR spectra were recorded on an Avatar 320FT-IR Thermo Nicolet spectrometer between 500 and 4000 cm^{-1} by direct measure.

3. Size Exclusion Chromatography

Mass average molar mass (\overline{M}_w) and dispersity ($\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} = \mathcal{D}$) values were measured by size exclusion chromatography (SEC) in THF at 40 °C (flow rate = 1.0 mL/min) on a GPC2502 Viscotek apparatus equipped with a refractive index detector Viscotek VE 3580 RI, a guard column Viscotek TGuard, Org 10x4.6mm, a LT5000L gel column (for samples soluble in organic medium) 300 x 7.8 mm and a GPC/SEC OmniSEC Software. The polymer samples were dissolved in THF (2 mg/mL). All elution curves were calibrated with polystyrene standards.

4. Differential Scanning Calorimetry

Glass transition temperatures (T_g) and melting temperatures (T_m) values were measured by differential scanning calorimetry (DSC). Measurements were acquired on a DSC Q2000 apparatus from TA Instruments under nitrogen flow at heating rate 10°C/min from -80 to 180°C.

II. Synthesis route of MLABe¹ (Figure 34)

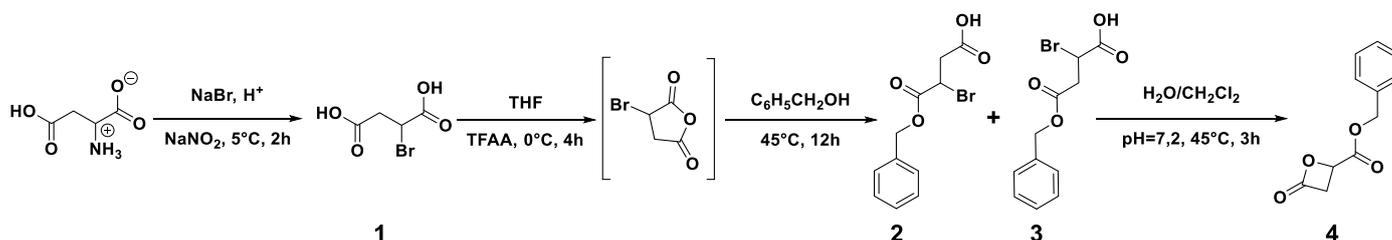
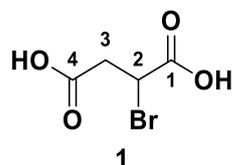


Figure 34 : Synthesis route of MLABe

1. Synthesis of RS-bromosuccinic acid ¹

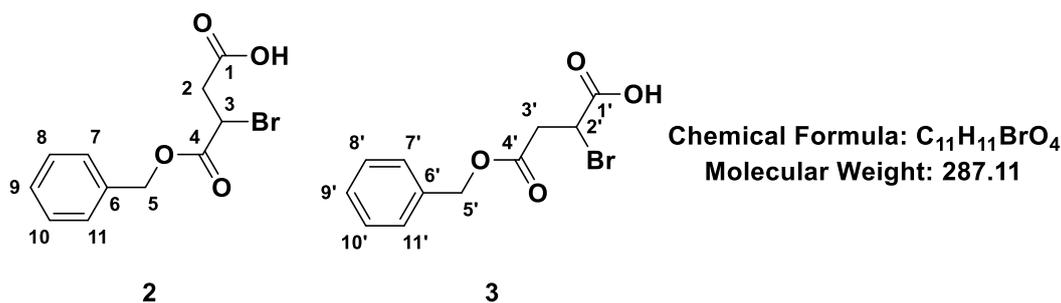


Chemical Formula: $C_4H_5BrO_4$
Molecular Weight: 196.98

100 g (0.75 mol) of DL-aspartic acid and 426 g (5.5 eq., 4.14 mol) of NaBr were dissolved in 1.6 L of 2N H_2SO_4 . The solution was cooled in an ice bath. 62.1 g (1.2 eq., 0.9 mol) of $NaNO_2$ were smoothly added on the previous mixture kept in the ice bath; the addition took about 1.5 h. The mixture was stirred for 30 min at 0 °C (ice bath) and the temperature was increased to room temperature. 8 g of urea were added and the mixture was stirred for 15 min at room temperature. The aqueous phase was extracted with 1 L of ethyl acetate in a first time and with 200 mL of ethyl acetate in a second time. Organic phases were gathered, dried over $MgSO_4$. After filtration, the solvent was evaporated to give a white powder which was recrystallized in acetonitrile (m = 131 g, yield = 89 %).

¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ 4.64 (dd, *J* = 8.7, 6.2 Hz, 1H, H₂), 3.25 (dd, *J* = 17.2, 8.7 Hz, 1H, H_{3α}), 3.02 (dd, *J* = 17.2, 6.2 Hz, 1H, H_{3β}).

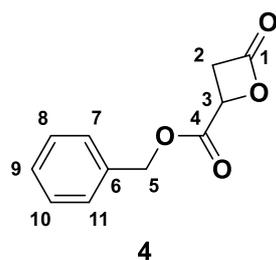
2. Synthesis of mixture of RS-3-benzoyloxycarbonyl-3-bromopropanoic acid and RS-2-bromo-3-benzoyloxycarbonylpropanoic acid ¹



41 g (0.021 mol) of diacid (compound **1**), dried under vacuum at 40 °C overnight, were kept under N₂ stream for 2 h. 79 mL of anhydrous THF were added under N₂ atmosphere. The mixture was cooled in an ice bath and 39 mL (1.3 eq., 0.063 mol) of trifluoroacetic anhydride (TFAA) were added. The mixture was stirred for 2 h at room temperature. THF, trifluoroacetic acid formed and the TFAA in excess were evaporated under vacuum leading to a brown oil. This oil was immediately put under N₂ atmosphere and 22 mL (1 eq., 0.021 mol) of benzyl alcohol were added. The mixture was stirred under N₂ atmosphere at room temperature for 12 h. 150 mL of diethyl ether were added and the mixture was washed with 3 x 50 mL of distilled water and 2 x 50 mL of brine. Organic phase was dried over MgSO₄. After filtration, the solvent was evaporated to give 60 g (yield=99 %) of a mixture of compounds **2** (72 %) and **3** (28 %).

¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ 7.50 – 7.15 (m, 5H, H_{Ar} and H_{Ar'}), 5.22 (d, 2H, H₅ 72% of lactonizable compound **2**), 5.16 (s, 2H, H₅ 28% of non-lactonizable compound **3**), 4.76 – 4.67 (m, 1H, H₃ and H_{2'}), 3.34 – 3.24 (m, 1H, H_{2α} and H_{3'α}), 3.14 – 3.02 (m, 1H, H_{2β} and H_{3'β}).

3. Synthesis of RS-4-benzyloxycarbonyl-2-oxetanone ¹



Chemical Formula: $C_{11}H_{10}O_4$
Molecular Weight: 206.20

60 g (72 % of lactonizable monoester compound **2**, 0.146 mol) of the monoesters mixture (compounds **2**, **3**) were dissolved in 300 mL diethyl ether and put in a beaker. 300 mL of water were added and a solution of 2 N NaOH was added until the pH reached 7.2. The aqueous phase was added over 300 mL of dichloromethane (stabilized with amylene). The mixture was vigorously stirred at 45 °C for 3 h. After decantation, the organic phase was washed with 2 x 300 mL of distilled water, 2 x 300 mL of brine and then dried over $MgSO_4$. After filtration, the dichloromethane was eliminated to lead to 35.2 g of crude lactone (compound **4**). This lactone was then purified by silica gel chromatography (methylene chloride / cyclohexane 10/90 up to 90/10). Finally this lactone was purified by distillation under vacuum. Boiling point = 220 °C at 3 mbar (m = 11,84 g, yield = 28 %).

¹H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ 7.47 – 7.28 (m, 5H, H_{Ar}), 5.27 (s, 2H, H_5), 5.11 (dd, $J = 6.7$, 4.4 Hz, 1H, H_3), 3.99 (dd, $J = 16.5$, 6.7 Hz, 1H, $H_{2\alpha}$), 3.72 (dd, $J = 16.5$, 4.4 Hz, 1H, $H_{2\beta}$).

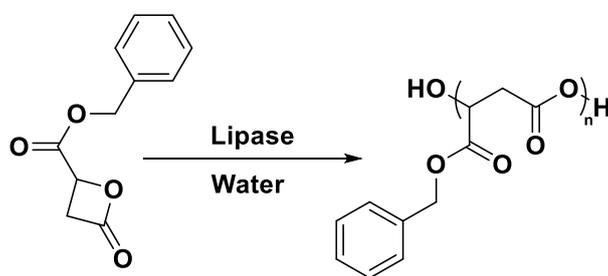
FT-IR (ν , cm^{-1}) 1840 (C=O, lactone) 1750 (C=O, ester)

III. Enzymatic polymerization

1. Enzymatic activity test

In a 96-wells micro plate, 175 μL of phosphate buffer (100 mM, pH = 7.2, NaCl 100 mM) were mixed with 20 μL of enzymatic solution (2 g/L prepared in phosphate buffer) and 5 μL of *p*-nitrophenyl butyrate (40 mM dissolved in 2-methyl-2-butanol). Absorbance at 405 nm was measured every 30 s over 10 min (Microplate Spectrophotometer powerwase XS/XS2, Biotek) and data evaluated with Gen5 Data Analysis Software (Biotek). Activity units are defined as μmol of *p*-nitrophenol released by minutes.

2. Enzymatic polymerization ²



Polymerization in solution

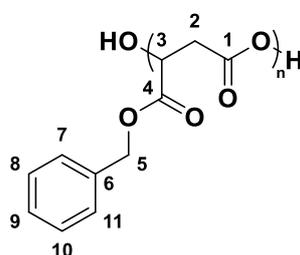
Experiments were realized in a 24-multi reactor Büchi Syncore Line. In a 30 mL-tube, porcine pancreatic lipase (amounts comprised between 66 units and 2,486 units) was mixed with lactone (weight comprised between 33.9 and 337.3 mg), buffer (Tris/HCl volume comprised between 333 and 666 μL , pH = 7 and concentration comprised between 10 and 200 mM, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 333 μL 105 mM pH7, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 333 μL 105 mM pH7 or distilled water) and toluene (volume comprised between 333 and 666 μL). The final volume was always 1 mL. Stirring was modulated between 300 and 480 rpm and temperature was maintained between 40 and 60 $^\circ\text{C}$.

Once the desired time elapsed, reaction was stopped by the addition of 5 mL of acetone or THF depending on the polymer solubility. Next the mixture was transferred in Eppendorf tubes and centrifuged during 3 min at 14,000 rpm. Supernatants were transferred in a separatory funnel. Separation was realized by adding 15 mL of distilled water and 15 mL of

chloroform. Organic phases were dried over MgSO_4 and filtered. Finally, solvents were evaporated under reduced pressure.

High molar mass polymers (more than 25 repetition units) were dissolved in chloroform and then precipitated in a large excess of cold diethyl ether. After elimination of the supernatant, polymers were dried under vacuum at room temperature

Conversion rate and hydrolysis rate were determined by ^1H NMR. Mass average molar mass and dispersity were determined by Size Exclusion Chromatography (SEC) using polystyrene standards. Melting temperature and glass transition temperature were determined by DSC.



^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ 7.57 – 7.19 (m, 5H, H_{Ar}), 5.67 – 5.46 (m, 1H, H_3), 5.38 – 4.92 (m, 2H, H_5), 3.17 – 2.73 (m, 2H, H_2).

Polymerization without organic solvent

Experiments were realized in a 24-multi reactor Büchi Syncore Line. In a 30mL-tube, porcine pancreas lipase (8.4 mg) was mixed with pure lactone (336 mg) and Tris/HCl buffer (125 μL , pH = 7, 105 mM). The mixture was stirred at 390 rpm and temperature was controlled at 60 $^\circ\text{C}$.

Purification and analysis methods were the same as described above.

Enzymes' screening

Effect of the enzyme's nature was investigated. Sixteen enzymes: (i) lipase from *Mucor javanicus*, (ii) lipase from *Candida cylindracea*, (iii) lipase from wheat germ Type I, (iv) lipase from *Candida rugosa* Type VII, (v) lipase from porcine pancreas, (vi) lipase from *Aspergillus oryzae*, (vii) lipase from *Rhizopus oryzae*, (viii) lipase from *Pseudomonas fluorescens*, (ix) lipase from *Candida rugosa* (mix), (x) lipase from *Rhizopus niveus*, (xi) lipase Amano M from *Mucor javanicus*, (xii) lipase Amano A from *Aspergillus niger*, (xiii) lipase from *Thermomyces*

lanuginosa, (xiv) lipase B from *Candida antarctica*, (xv) lipase from *Penicillium roqueforti*, (xvi) esterase from porcine liver; were used for these experiments.

All these enzymes are commercially available from Sigma and used as received.

Mass of each enzyme was calculated in function of its specific activity on *p*-nitrophenyl butyrate (Table 1).

Table 1 : Specific activity and calculated mass of each enzyme

Enzyme	Specific activity (U/mg)	Mass (mg)
Lipase from <i>Mucor javanicus</i>	42	14,7
Lipase from <i>Candida cylindracea</i>	476	1,3
Lipase from wheat germ Type I	9	70,2
Lipase from <i>Candida rugosa</i> Type VII	246	2,5
Lipase from porcine pancreas	73	8,4
Lipase from <i>Aspergillus oryzae</i>	178	3,5
Lipase from <i>Rhizopus oryzae</i>	168	4,5
Lipase from <i>Pseudomonas fluorescens</i>	353	3,7
Lipase from <i>Candida rugosa</i> (mix)	485	1,7
Lipase from <i>Rhizopus niveus</i>	89	1,3
Lipase Amano M from <i>Mucor javanicus</i>	80	6,9
Lipase Amano A from <i>Aspergillus niger</i>	73	7,7
Lipase from <i>Thermomyces lanuginosa</i>	79	8,4
Lipase B from <i>Candida antarctica</i>	190	7,8
Lipase from <i>Penicillium roqueforti</i>	29	3,3
Esterase from porcine liver	137	21,5

Experiment, purification, and analysis methods were the same as described in polymerization without solvent.

IV. References

- (1) Cammas, S.; Renard, I.; Langlois, V.; Guerin, P. Poly(β -Malic Acid): Obtaining High Molecular Weights by Improvement of the Synthesis Route. *Polymer* **1996**, *37* (18), 4215–4220 DOI: 10.1016/0032-3861(96)00204-2.
- (2) Casajus, H.; Tranchimand, S.; Wolbert, D.; Nugier-Chauvin, C.; Cammas-Marion, S. Optimization of Lipase-Catalyzed Polymerization of Benzyl Malolactonate through a Design of Experiment Approach. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134* (11) DOI: 10.1002/app.44604.

Chapitre 2

Etudes mécanistiques et cinétiques de la
polymérisation enzymatique du
malolactonate de benzyle

Chapitre 2 : Etudes mécanistiques et cinétiques de la polymérisation enzymatique du malolactonate de benzyle

Les derniers résultats du chapitre précédent concernant les températures de fusion (Tableau 19, page 91) nous amènent à nous interroger sur le mode d'action de l'enzyme lors de la réaction de polymérisation. En effet, les PMLABe, obtenus par polymérisation anionique par ouverture de cycle du malolactonate de benzyle (MLABe) racémique, en présence d'un sel de carboxylate (polymères dits chimiques), n'ont pas de température de fusion, seule une température de transition vitreuse est mesurée mettant en évidence le caractère amorphe de tels polymères. Nous avons donc réalisé, dans un premier temps, des analyses calorimétriques complémentaires (calorimétrie différentielle à balayage, DSC) pour confirmer ces résultats. Ainsi, nous avons synthétisé des PMLABe par voie chimique ou par voie enzymatique à partir de MLABe racémique ou optiquement actif (*R*-MLABe ou *S*-MLABe).

Les polymères synthétisés par voie chimique ont été obtenus en mélangeant le MLABe racémique ou optiquement actif (1 eq.) avec l'amorceur, du benzoate de tétraéthylammonium ($7 \cdot 10^{-3}$ eq.), sous atmosphère inerte. La réaction a lieu à 40 °C sous agitation magnétique. Une fois la réaction terminée (disparition de la fonction carbonyle du cycle lactonique à 1850 cm^{-1} suivie par infra-rouge), le polymère est dissous dans du chloroforme puis précipité dans de l'éther froid avant l'analyse DSC.

Les polymères synthétisés par voie enzymatique ont été obtenus en mélangeant la lipase de pancréas de porc (PPL) solubilisée dans du tampon Tris/HCl (105 mM, pH 7) avec le MLABe racémique ou optiquement actif (ratio PPL/MLABe 1/40). La réaction se déroule à 60 °C, sous agitation pendant 72 h. Une fois la réaction terminée, le polymère dissous dans du chloroforme est placé dans une ampoule à décanter. Après l'ajout d'eau distillée et de saumure, les phases sont séparées. La phase organique est récupérée puis évaporée. Enfin, le polymère est précipité dans de l'éther froid et analysé.

Les résultats des analyses DSC sont présentés dans le Tableau 20. Un (1) signifie que la valeur a été mesurée au premier scan et un (2) au deuxième scan.

Tableau 20 : Résultats des analyses calorimétriques de différents polymères en fonction de la voie de synthèse

Monomère	Voie de synthèse	T _g (°C)	T _f (°C)
MLABe racémique	Chimique	16 (2) (Figure 35)	---
R-MLABe	Chimique	30 (2)	151 (1)
MLABe racémique	Enzymatique	13 (2) (Figure 36)	77 (1)
R-MLABe	Enzymatique	27 (2)	89 (1)

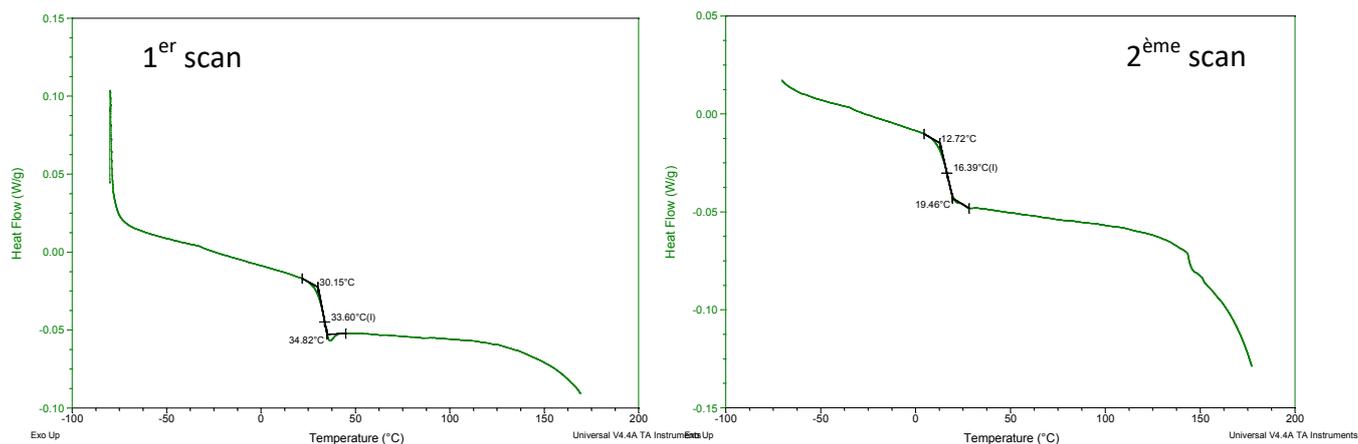


Figure 35 : 1^{er} et 2^{ème} scan du polymère synthétisé par voie chimique à partir du MLABe racémique

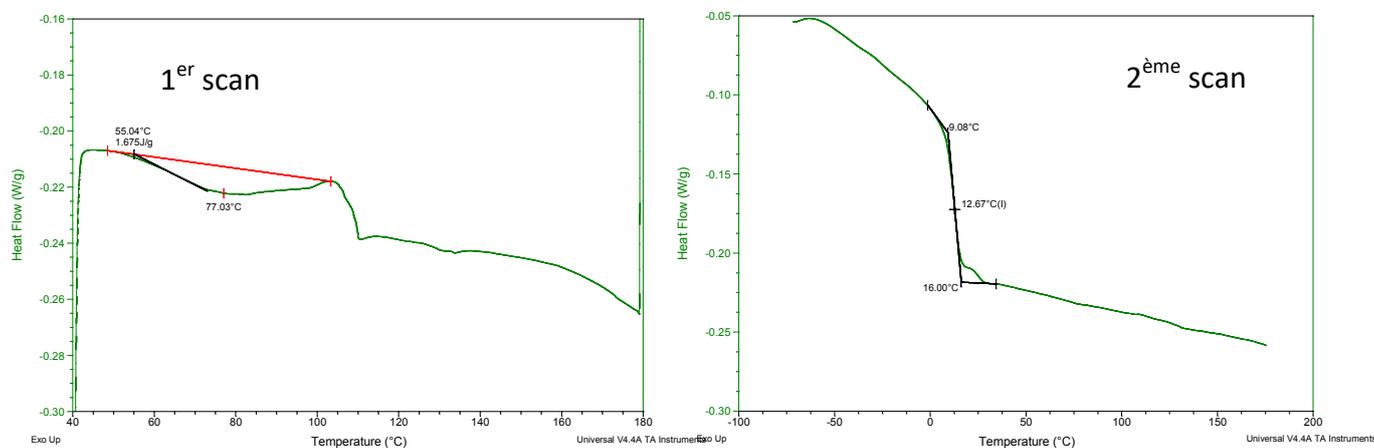


Figure 36 : 1^{er} et 2^{ème} scan du polymère synthétisé par voie enzymatique à partir du MLABe racémique

Les analyses complémentaires confirment les résultats déjà observés précédemment, à savoir que les polymères synthétisés par voie enzymatique à partir du monomère racémique possèdent une température de fusion contrairement à ceux synthétisés par voie chimique. Les polymères synthétisés à partir du R-MLABe possèdent une température de fusion quelle que soit la voie de synthèse. Toutefois, la température de fusion des polymères synthétisés

par voie chimique est plus élevée, que celle des mêmes polymères obtenus par voie enzymatique, comme le montre les résultats rassemblés dans le Tableau 20. Cette différence peut être due à la différence de masse molaire : en effet, le polymère synthétisé par voie chimique a une masse molaire 15 fois supérieure à celle observée par le polymère synthétisé par voie enzymatique.

Pour expliquer la température de fusion observée sur les polymères synthétisés par voie enzymatique à partir du mélange racémique, nous avons émis l'hypothèse suivante : l'enzyme réagit préférentiellement avec l'un des deux énantiomères (*R* ou *S*) parmi le mélange racémique, ce qui conduit à la formation d'un copolymère à blocs organisé et donc semi-cristallin.

Par exemple, si l'enzyme a une meilleure affinité pour l'énantiomère *R*, elle polymériserait en premier lieu ce monomère et un premier bloc *R* serait alors formé. Ensuite, la concentration en monomère *R* diminuant, l'enzyme formerait un bloc aléatoire composé des monomères *R* et *S*. Enfin, lorsque le monomère *R* est épuisé, l'enzyme réagirait avec le monomère *S* pour former un troisième bloc *S* (Figure 37). L'enzyme n'est pas énantiosélective puisque les taux conversions observés sont bien supérieur à 50 % mais une énantio-préférence pourrait aboutir à la formation d'un copolymère à blocs *R*, *RS* et *S*.

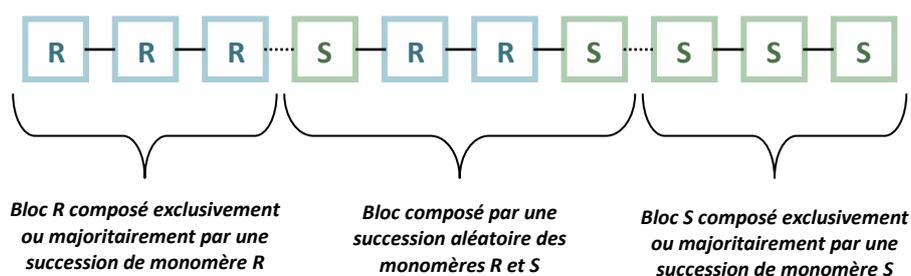


Figure 37 : Structure hypothétique du polymère obtenu par voie enzymatique à partir du MLABe racémique

Les lipases étant souvent utilisées pour leurs propriétés de sélectivité ¹, il est envisageable que la lipase de pancréas de porc ait une meilleure réactivité avec l'un des deux énantiomères du MLABe.

I. Etude cinétique de la polymérisation enzymatique du MLABe (RS, R et S)

Afin de confirmer cette hypothèse, les lactones R et S ont été synthétisées et une étude de la cinétique de polymérisation a été menée. Si l'enzyme a une affinité plus forte pour l'un des deux énantiomères, cela devrait apparaître au niveau de la vitesse de réaction et donc sur le taux de conversion.

1. Cinétique de polymérisation avec les lactones RS, R et S.

Pour les trois lactones (RS, R et S), la polymérisation enzymatique est réalisée selon les conditions optimisées et extrapolées du plan d'expérience. Cependant, les premières expériences avec les monomères optiquement actifs du MLABe (R et S) mettent en évidence une prise en masse rapide du milieu. Les transferts de matière deviennent alors limitants et il est impossible de déterminer une quelconque énantio-préférence de l'enzyme dans ces conditions réactionnelles. Les monomères sont alors dissous dans du toluène pour s'affranchir de cette problématique. Des cinétiques sur 72 h sont ainsi réalisées avec du MLABe à 2,45 M dans le toluène et une solution de PPL à 25 mg/mL dans du tampon Tris/HCl (105 mM, pH 7) en utilisant un ratio phase aqueuse / phase organique de 2 / 1. Les réactions sont menées à 60 °C sous agitation et arrêtées aux différents temps de la cinétique (5 h, 9 h, 24 h, 33 h, 48 h et 72 h) par l'ajout de 5 volumes de chloroforme. Les polymères sont ensuite purifiés en suivant le protocole décrit précédemment.

Les taux de conversion et d'hydrolyse sont déterminés par RMN ¹H en utilisant la méthode de calcul décrite dans le Chapitre 1 (page 51). Les masses molaires moyennes en masse et la dispersité sont mesurées par SEC dans le THF (standards polystyrènes) avant précipitation.

Le pouvoir rotatoire des polymères est déterminé par polarimétrie (chloroforme, c = 1) après précipitation de ces derniers dans de l'éther diéthylique froid.

La cinétique ayant été réalisée une seule fois, il est important de garder en tête que les différences observées, si elles sont minimes, peuvent être une conséquence de la variabilité de l'expérimentation et non de réelles différences dans les cinétiques de polymérisation des différents énantiomères du MLABe.

Le Tableau 21 regroupe les résultats obtenus lors de cette cinétique :

Tableau 21 : Résultats de la cinétique de polymérisation des différents énantiomères du MLABe

Monomère	Temps (h)	Taux de conversion	Taux d'hydrolyse	\overline{M}_w en g/mol	D	$[\alpha]_D^{25^\circ C}$
RS-MLABe	5	0%	0%	200	1,1	-1
	9	29%	2%	1650	1,6	-1
	24	65%	3%	1900	1,5	-1
	33	79%	3%	1900	1,5	0
	48	84%	2%	2750	1,4	0
	72	99%	6%	2300	1,5	-3
R-MLABe	5	3%	0%	1700	1,5	-13
	9	33%	2%	1700	1,5	-14
	24	67%	2%	1800	1,5	-8
	33	84%	4%	1500	1,5	-14
	48	91%	3%	1100	1,6	-14
	72	99%	6%	1400	1,9	-11
S-MLABe	5	0%	0%	1900	1,5	+16
	9	25%	2%	1700	1,4	+12
	24	64%	3%	1650	1,5	+8
	33	80%	2%	1750	1,9	+11
	48	85%	6%	1700	1,8	+10
	72	98%	4%	1600	1,9	+18

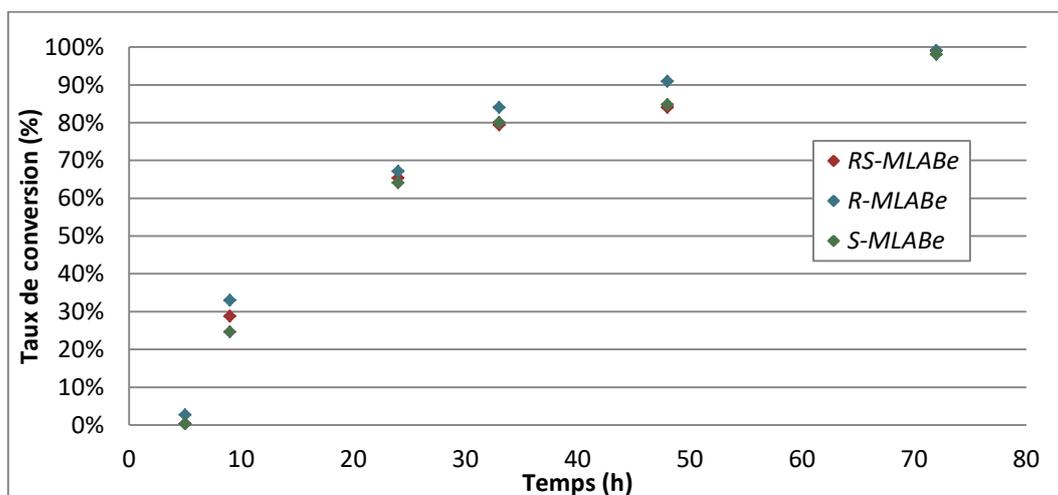


Figure 38 : Evolution du taux de conversion au cours du temps en fonction de la chiralité du monomère

La lipase de pancréas de porc est capable de polymériser le MLABe quelle que soit sa configuration et jusqu'à une conversion proche de 100% pour les trois lactones (Figure 38). L'évolution du taux de conversion est similaire quelle que soit la lactone polymérisée. Toutefois, la conversion du R-MLABe semble légèrement plus rapide (en rouge sur la Figure 38). Cependant, l'écart le plus important est seulement de 8 %, entre le taux de conversion du S-MLABe (25 % de conversion) et celui du R-MLABe (33 % de conversion), après 9 h de

polymérisation. Dans ces conditions et sans une étude statistique pour mesurer la répétabilité de l'expérience, il est difficile de parler d'une énantio-préférence.

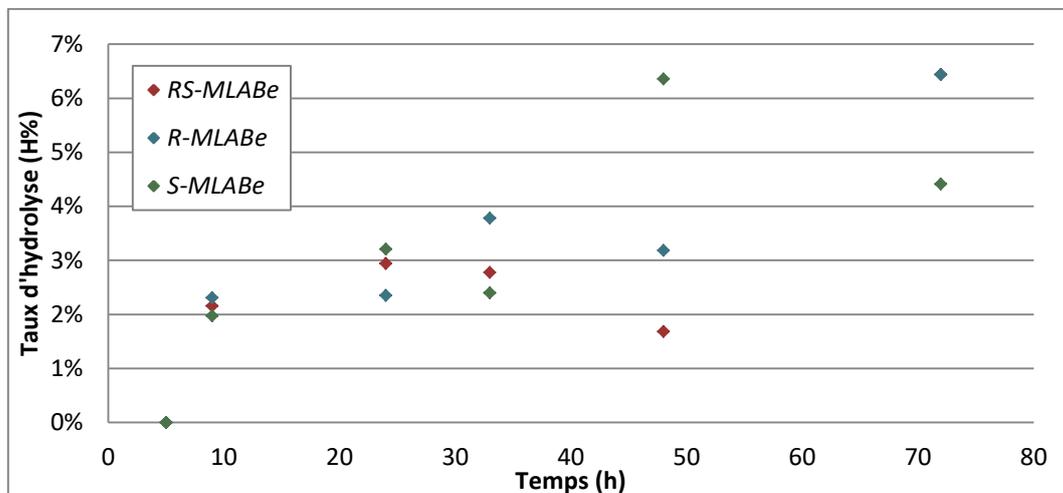


Figure 39 : Evolution du taux d'hydrolyse au cours du temps en fonction de la chiralité du monomère

Le taux d'hydrolyse (Figure 39) reste faible tout au long de la polymérisation (inférieur à 7% quel que soit le monomère). Toutefois, une augmentation de 4 % du taux d'hydrolyse est observée pour le R-MLABe et le RS-MLABe, dans les dernières 24h de la réaction lorsque les taux de conversion sont élevés (supérieur à 80%). Il est possible que la concentration en lactone étant plus faible, celle-ci n'entre plus en compétition avec l'ester et la vitesse de l'hydrolyse de ce dernier est augmentée. Les différences observées restent toutefois minimales et, sans une étude statistique, peu significatives.

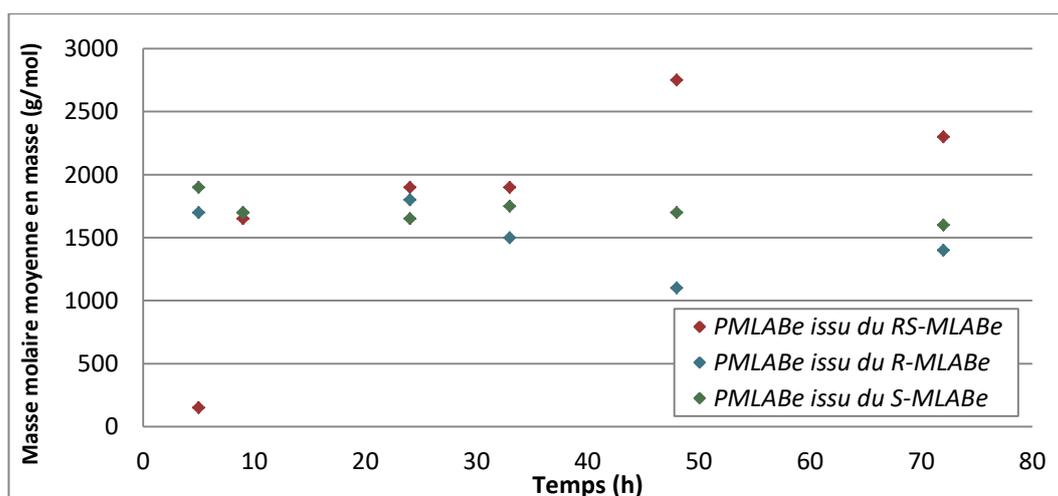


Figure 40 : Evolution de la masse molaire moyenne en masse des PMLABe au cours du temps en fonction de la chiralité du monomère

Les polymères issus du *RS*-MLABe (en bleu sur la Figure 40) ont des masses molaires moyennes en masse qui augmentent au cours de la polymérisation (200 à 2 300 g/mol). Une diminution de 450 g/mol est observée entre 48 et 72 h, due peut-être à une hydrolyse des polymères.

Contrairement aux polymères issus du *RS*-MLABe, ceux issus des MLABe optiquement actifs (en rouge et en vert sur la Figure 40) ont des masses molaires moyennes en masse stables au cours du temps (700 g/mol de différence entre les deux extrêmes pour le polymère synthétisé à partir *R*-MLABe et 300 g/mol pour celui synthétisé à partir du *S*-MLABe). Les polymères optiquement actifs sont par nature semi-cristallins et donc moins flexibles que les polymères racémiques. Il est possible, qu'à partir d'un certain degré de polymérisation, le polymère ne puisse plus interagir avec l'enzyme et son site catalytique. Cette limite se situerait aux alentours de la dizaine d'unités monomères. Par contre, des polymères racémiques avec plus d'une cinquantaine d'unités monomères ont été synthétisés dans certaines conditions. Lors de cette expérience et après précipitation, les polymères racémiques étaient composés d'une vingtaine d'unités monomères contre une dizaine pour les polymères optiquement actifs.

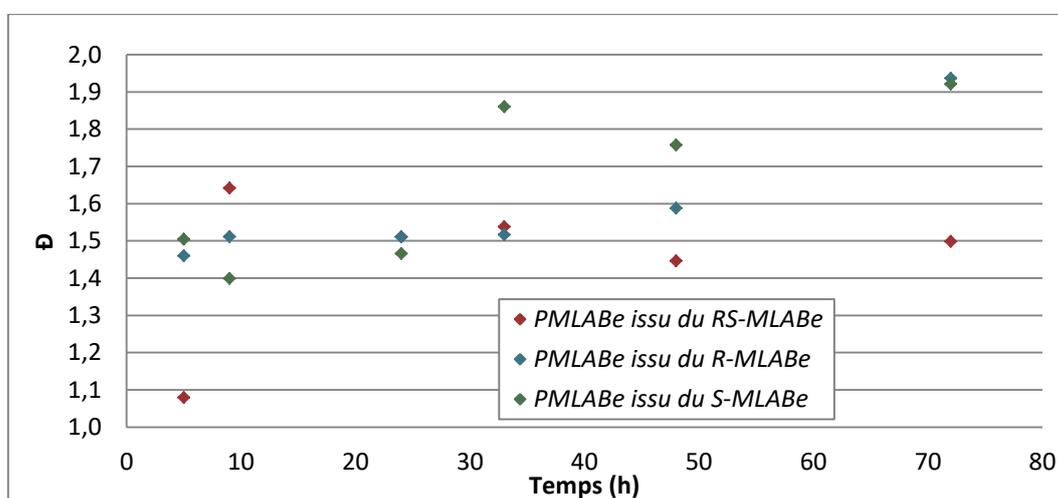


Figure 41 : Evolution de la dispersité des PMLABe au cours du temps en fonction de la chiralité du monomère

La dispersité des PMLABe racémiques (en bleu sur la Figure 41) reste constante et proche de 1,5 durant la polymérisation. Les polymères issus des monomères optiquement actifs (en rouge et vert sur la Figure 41) ont des dispersités qui augmentent dans les derniers temps de la réaction jusqu'à atteindre 1,9 au bout de 72h de réaction. La plus grande cristallinité des polymères optiquement actifs a tendance à rendre le milieu réactionnel hétérogène gênant

le transfert de matière. L'agitation n'est plus suffisante pour assurer l'homogénéité du mélange et la dispersité des polymères synthétisés augmente.

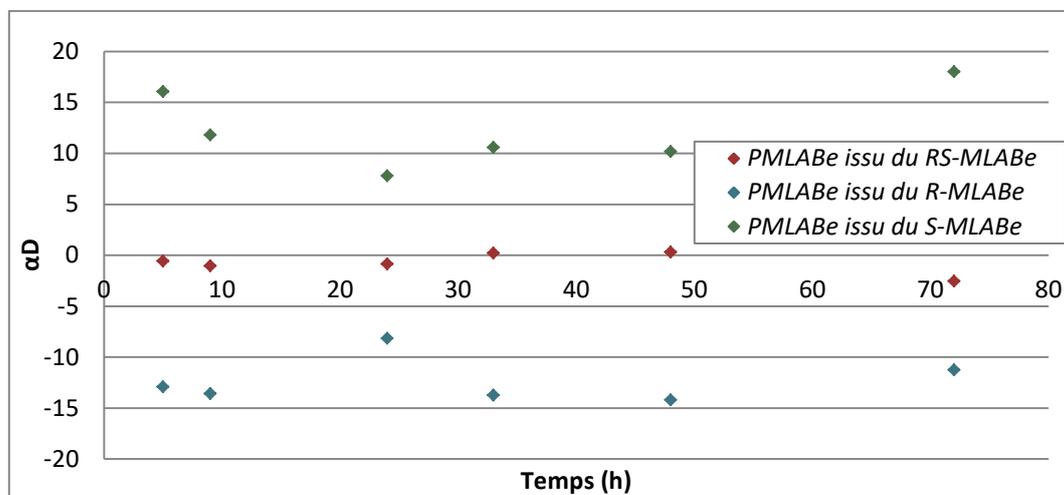


Figure 42 : Evolution du pouvoir rotatoire des PMLABe au cours du temps et en fonction de la chiralité du monomère

Les polymères même purs étant toujours un mélange de macromolécules de masses différentes, il est délicat de comparer les valeurs des pouvoirs rotatoires au cours du temps. En effet, ils sont directement liés aux masses molaires et à la dispersité des polymères ainsi qu'à une possible organisation. Toutefois, la Figure 42 permet de se rendre compte que le PMLABe racémique ne possède jamais de pouvoir rotatoire et ce même dans les premiers temps de la réaction. De plus, les polymères issus des monomères optiquement actifs ont des pouvoirs rotatoires de sens contraire et de valeurs à peu près similaires en valeur absolue (+18 pour le PMLABe obtenu à partir du S-MLABe et -11 pour le PMLABe obtenu à partir du R-MLABe après 72 h de réaction). La polymérisation enzymatique du MLABe conserve la chiralité puisque les PMLABe synthétisés à partir des monomères chiraux conservent un pouvoir rotatoire.

2. Détermination de l'ordre de la cinétique réactionnelle

A partir des données expérimentales, il est possible de déterminer l'ordre de la cinétique. Dans la littérature, à notre connaissance, il n'existe qu'une seule étude cinétique sur les lactones substituées telles que le MLABe, il s'agit du travail de Panova *et al.* qui a montré que la polymérisation enzymatique du malolactonate de propyle suivait une cinétique d'ordre 1². Autrement dit, la vitesse de consommation du monomère est directement proportionnelle à la concentration de celui-ci, et peut être représentée via l'Équation 3.

$$v = - \frac{\partial n}{\partial t} = k n$$

avec :

v la vitesse de la réaction (mmol/h)
 n le nombre de moles de monomère présent au temps t (mmole)
 t le temps de la réaction (h)
 k la constante de vitesse (h^{-1})

Équation 3 : Vitesse de réaction pour une réaction d'ordre 1

Pour s'assurer que la réaction est bien d'ordre 1, il est possible de linéariser l'Équation 3 et de vérifier que le tracé des résultats expérimentaux forment bien une droite. Dans le cas contraire, la réaction n'est pas d'ordre 1.

La linéarisation de l'Équation 3 conduit à l'Équation 4:

$$v = - \frac{\partial n}{\partial t} = k n$$

$$- \frac{\partial n}{n} = k \partial t$$

$$-[\ln(n)]_0^t = k [t]_0^t$$

$$\ln \left(\frac{n_0}{n_t} \right) = k t$$

avec :

n_0 le nombre de moles de MLABe au début de la réaction (mmol)
 n_t le nombre de moles de MLABe au temps t (mmol)
 k la constante de vitesse (h^{-1})
 t le temps de la réaction (h)

Équation 4 : Linéarisation de l'équation de vitesse pour une réaction d'ordre 1

Grâce au taux de conversion, il est possible de déterminer le nombre de mole de MLABe restant dans le milieu au temps t (Équation 5).

$$X = \frac{n_0 - n_t}{n_0}$$

$$X = 1 - \frac{n_t}{n_0}$$

$$n_t = n_0(1 - X)$$

avec :

X taux de conversion au temps t
 n_0 le nombre de mole de MLABe au début de la réaction (mmol)
 n_t le nombre de mole au temps t (mmol)

Équation 5 : Calcul du nombre de moles à l'instant t en fonction du taux de conversion

Le Tableau 22 donne les résultats obtenus après calculs (Équation 5).

Tableau 22 : Résultats des calculs du nombre de moles de monomère au cours du temps

Monomère	Temps (h)	Taux de conversion	n_t (mmol)	$\ln(n_0/n_t)$
RS-MLABe	5	0%	1,63	0,00
	9	29%	1,16	0,34
	24	65%	0,57	1,06
	33	79%	0,34	1,58
	48	84%	0,26	1,83
	72	99%	0,02	4,62
R-MLABe	5	3%	1,59	0,03
	9	33%	1,09	0,40
	24	67%	0,54	1,11
	33	84%	0,26	1,83
	48	91%	0,15	2,40
	72	99%	0,02	4,62
S-MLABe	5	0%	1,63	0,00
	9	25%	1,23	0,28
	24	64%	0,59	1,02
	33	80%	0,33	1,61
	48	85%	0,25	1,88
	72	98%	0,03	3,93

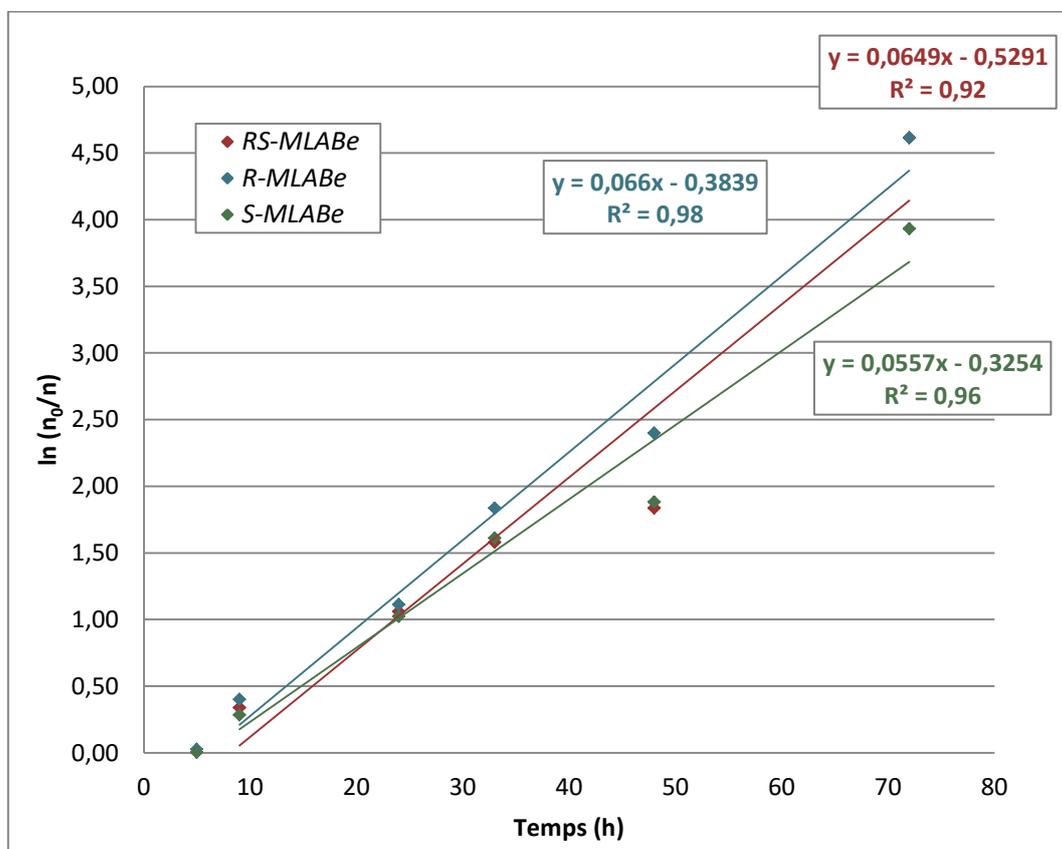


Figure 43 : Evolution du logarithme $\ln(n_0/n_t)$ au cours du temps en fonction de la chiralité des monomères

Le coefficient de régression linéaire (noté R^2 sur la Figure 43) évalue la concordance entre l'équation du modèle théorique (les droites) et la distribution des points expérimentaux. Plus ce coefficient est proche de 1, meilleure est l'adéquation entre l'équation et la distribution des points expérimentaux.

Ici, les coefficients de régression sont tous supérieurs à 0,9, ce qui indique une bonne adéquation en tenant compte des conditions expérimentales et de leurs limites. En effet, pour ce genre de réaction, il est souhaitable de réaliser des répliquas pour éviter que des erreurs expérimentales ne biaisent les résultats. La réalisation d'une étude cinétique demande, dans notre cas, une grande quantité de monomères, c'est pourquoi nous ne l'avons réalisée qu'une seule fois. De plus, la RMN ^1H , grâce à laquelle le taux de conversion est évalué, possède une erreur de mesure inhérente d'environ 5 %. C'est pourquoi il semble cohérent de dire que la cinétique de consommation du monomère suit une cinétique d'ordre 1. Par contre, il est beaucoup plus délicat de tirer de conclusions quant à la réactivité préférentielle de l'enzyme avec un des énantiomères du MLABe. D'après la Figure 43, le *R*-MLABe semble être consommé plus rapidement que les deux autres (2 % plus rapidement que le *RS*-MLABe et 16% plus rapidement que le *S*-MLABe). Il est, cependant, difficile de savoir si cette différence est liée à une énantio-préférence de la lipase ou un biais expérimental. Il est également intéressant de remarquer qu'un temps de latence est observé. En effet, après 5 h de réaction les taux de conversion sont très faibles et ce quel que soit le monomère utilisé (de 0 à 3 %), c'est la raison pour laquelle ce premier point n'a pas été considéré dans la régression linéaire.

Une analyse complémentaire a été réalisée, cette fois sur les monomères non consommés, pour vérifier si la proportion des deux énantiomères était la même. En effet, lorsque les polymères sont purifiés par précipitation dans de l'éther froid, le monomère non consommé est solubilisé dans l'éther diéthylique. Il est donc possible de mesurer l'excès énantiomérique, après évaporation du solvant. Après 9h de réaction, l'excès énantiomérique mesuré est de 50 %. Les deux énantiomères du mélange racémique sont donc bien consommés à la même vitesse.

3. Conclusions

L'hypothèse avancée pour expliquer l'organisation des polymères synthétisés par voie enzymatique à partir du MLABe racémique est invalidée. En effet, trois résultats la contredisent. Premièrement, les vitesses de consommation du monomère suivent une cinétique d'ordre 1, mais les différences de vitesse observées sont trop faibles pour valider une quelconque préférence pour l'un ou l'autre des deux énantiomères du MLABe. Deuxièmement, si l'enzyme formait dans un premier temps des blocs *R* ou *S* selon sa préférence, des pouvoirs rotatoires négatifs ou positifs devraient être observés au début de la réaction sur le polymère issu du RS-MLABe, or ce n'est pas le cas. Troisièmement, un excès énantiomérique, devrait être mesuré sur le RS-MLABe non consommé après 9 h de réaction, dû à une proportion supérieure du monomère le moins réactif (conversion de 25 à 33 %, selon les monomères), or ce n'est pas le cas.

Une nouvelle hypothèse a été avancée pour expliquer l'organisation des polymères obtenus par voie enzymatique à partir du RS-MLABe. Il est possible que la conformation de l'enzyme provoque un enchaînement régulier et systématique, en alternant les énantiomères *R* et *S* du MLABe. Ainsi, comme le montre la Figure 44, chaque nouveau monomère intégré serait de sens opposé au précédent. Cette répétition structurelle provoquerait une organisation tridimensionnelle et aboutirait à la synthèse d'un polymère ayant une température de fusion.



Figure 44 : Structure hypothétique du polymère obtenu par voie enzymatique à partir du RS-MLABe

Pour connaître la régularité des configurations des carbones asymétriques d'un polymère, une étude de la tacticité est nécessaire.

II. Etude de la tacticité des PMLABe

1. Concepts théoriques

La tacticité d'un polymère est définie par Allcock et Lampe³ comme étant la séquence des centres asymétriques le long de la chaîne principale.

Trois séquences différentes existent et le polymère peut-être :

- Atactique : la séquence des centres asymétriques est totalement aléatoire (Figure 45).

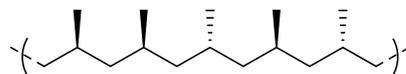


Figure 45 : Représentation schématique d'un polymère atactique

- Isotactique : la séquence des centres asymétriques est uniforme (Figure 46). Toutes les unités de la chaîne ont la même configuration (*R* ou *S*).

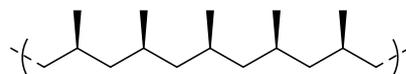


Figure 46 : Représentation schématique d'un polymère isotactique

- Syndiotactique : la séquence des centres asymétriques est alternée (Figure 47). Chaque unité de la chaîne a une configuration opposée à la précédente et à la suivante.

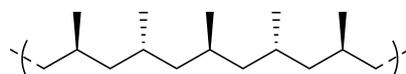


Figure 47 : Représentation schématique d'un polymère syndiotactique

La tacticité du PMLABe est étudiée par RMN ^{13}C en analysant l'enchaînement de deux ou de trois unités monomères appelés diade ou triade, respectivement.

Il existe deux diades possibles (Figure 48) : soit les deux unités monomères ont la même configuration, diade *méso* (*m*), soit les deux unités monomères ont des configurations opposées, diade *racémo* (*r*).

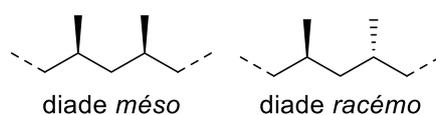


Figure 48 : Les deux types de diades possibles

Pour les triades, quatre enchaînements existent (Figure 49) :

- Les trois unités monomères ont la même configuration, ce qui équivaut à deux diades *méso* successives (*mm*).
- Les deux premières unités ont la même configuration mais la troisième est de configuration opposée ce qui équivaut à une diade *méso* suivi d'une diade *racémo* (*mr*).
- La première unité a une configuration opposée aux deux dernières ce qui équivaut à une diade *racémo* suivi d'une diade *méso* (*rm*).
- La première et la dernière unité monomère ont la même configuration et celle-ci est opposée à la deuxième unité monomère, ce qui équivaut à deux diades *racémo* successives (*rr*).

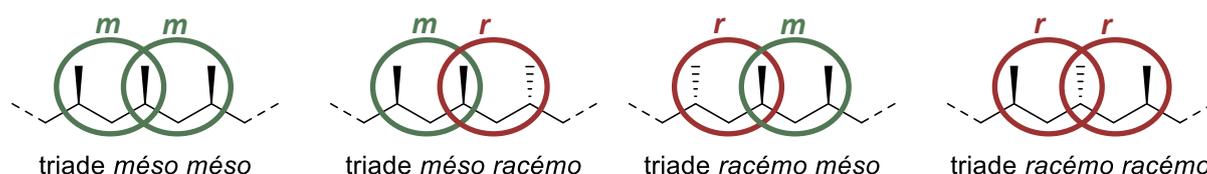


Figure 49 : Les quatre types de triades possibles

La tacticité du PMLABe a déjà été étudiée et l'assignation des pics aux différentes triades est connue⁴.

La Figure 50 représente le spectre RMN ^{13}C du PMLABe synthétisé à partir du RS-MLABe avec l'assignation des différents pics.

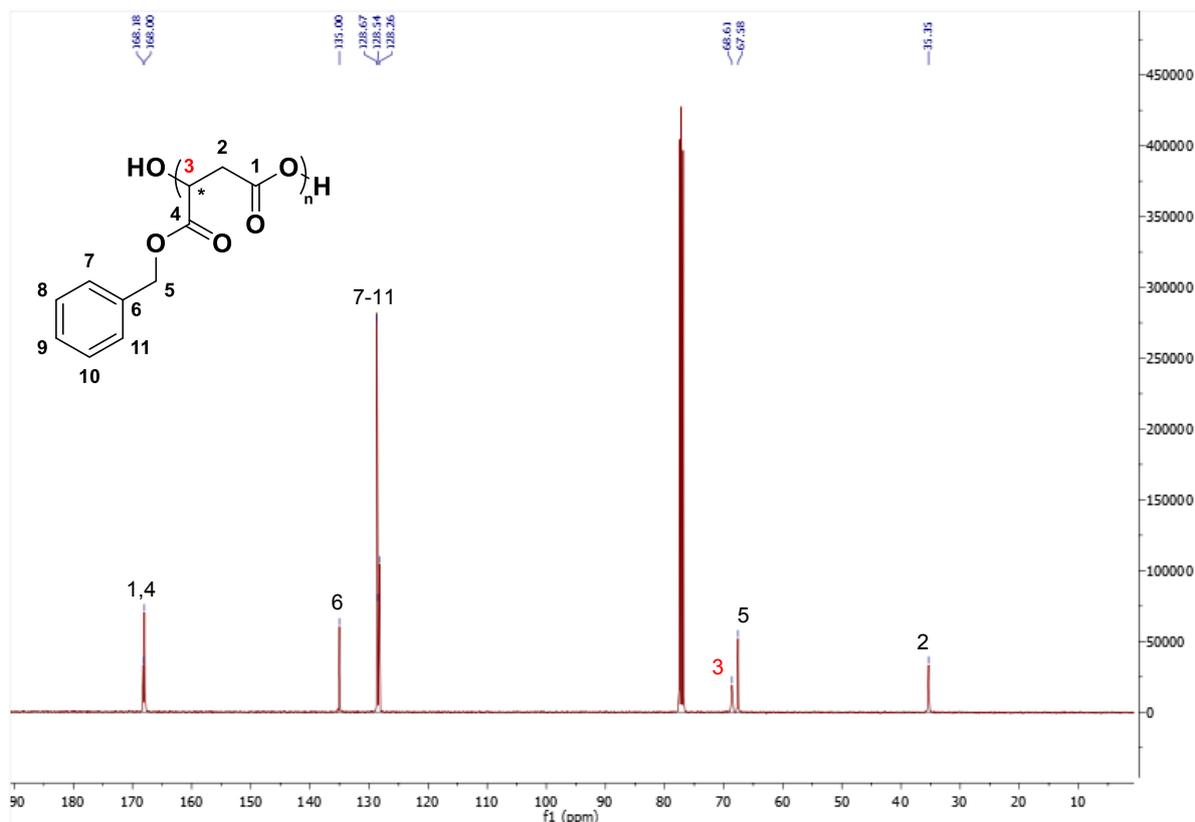


Figure 50 : Spectre RMN ^{13}C du PMLABe dans CDCl_3

La zone qui nous intéresse est située entre 68 et 69 ppm : elle correspond à la zone du carbone asymétrique (carbone noté 3 sur la Figure 50). La Figure 51 montre le zoom de cette zone, il permet d'observer les différents signaux liés aux triades.

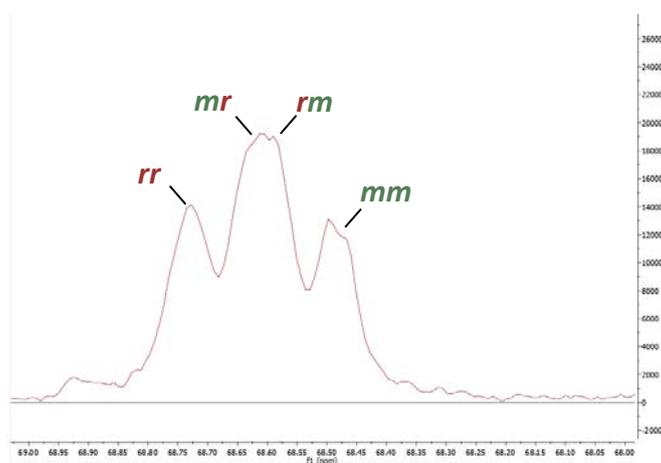


Figure 51 : Zoom du spectre RMN ^{13}C de la zone correspondant au carbone asymétrique

Pour connaître la tacticité d'un polymère, il faut mesurer et comparer les aires sous chaque pic. Pour un polymère atactique, la probabilité d'un enchaînement *méso* est égale à la probabilité d'un enchaînement *racémo*, soit 50 %. Pour les triades, comme il en existe quatre types, il y a donc 25 % de probabilité pour chacune d'elle. Cette équiprobabilité se retrouve dans les aires de chaque pic qui doivent être égales entre elles. Si l'aire du pic correspondant à la triade *mm* est supérieure à celle des autres pics, alors le polymère aura un caractère isotactique. Plus cette différence d'aire est grande, plus le caractère isotactique du polymère est important. De même, si l'aire correspondant à la triade *rr* est supérieure, alors le polymère possède un caractère syndiotactique.

2. Analyses des différents PMLABe et résultats

Deux polymères synthétisés par voie chimique à partir du *RS*-MLABe et *R*-MLABe, et deux polymères synthétisés par voie enzymatique à partir des mêmes monomères ont donc été analysés par cette méthode. La Figure 52 regroupe les zooms de la zone qui nous intéresse (entre 68 et 69 ppm) des spectres RMN ^{13}C obtenus pour les quatre polymères pris en compte dans cette étude.

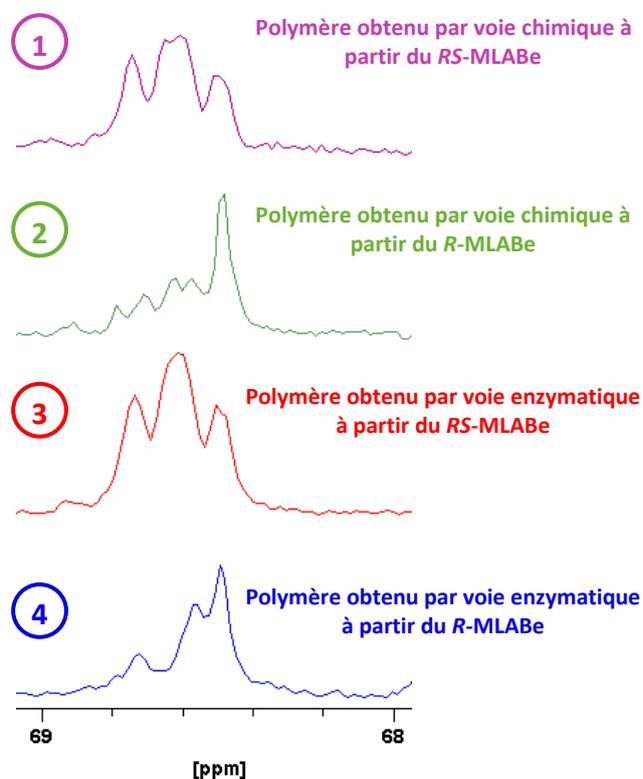


Figure 52 : Zoom de la zone entre 68 et 69 ppm des spectres ^{13}C des polymères étudiés

Deux profils bien distincts sont observés sur la Figure 52 en fonction de la chiralité du monomère utilisé lors de la polymérisation. Les zooms 1 et 3 sont extraits des spectres RMN ^{13}C obtenus pour les polymères synthétisés à partir du monomère racémique ; ils présentent une répartition homogène des quatre triades, mais il est difficile d'identifier les triades *rm* et *mr*. Cependant, ces spectres sont caractéristiques de polymères atactiques puisque les aires des pics correspondant aux quatre triades semblent égales. Les zooms 2 et 4 sont extraits des spectres RMN ^{13}C obtenus pour les polymères synthétisés à partir du *R*-MLABe et présentent un pic majoritaire à 68,45 ppm, correspondant à la triade *mm*. Cette répartition est logique puisqu'en présence d'un seul énantiomère, la configuration est toujours la même et donc les triades *mm* sont les seules possibles. La présence des autres triades indiquent soit une pureté optique inférieure à 100 % sur le MLABe avant la réaction (excès énantiomérique de 93 % pour le *R*-MLABe), soit une racémisation partielle (inversion ou rétention partielle) du carbone asymétrique lors de la polymérisation. Le calcul des aires de chaque pic permet d'affiner les suppositions sur la tacticité des PMLABe étudiés.

Les pics correspondant aux différentes triades se chevauchant, il est nécessaire d'effectuer une déconvolution des pics pour déterminer l'aire de chaque pic. Nous avons pour notre part utilisé le module de déconvolution Gauss/Lorentz du logiciel Topspin sur la zone d'intérêt (68-69 ppm). Après avoir déterminé le nombre et la position des pics qui nous intéressent, nous avons choisi le pourcentage de gaussienne de chaque pic pour l'ajuster au profil réel du spectre, et enfin lancé la déconvolution. L'objectif est que la déconvolution obtenue se rapproche le plus du spectre original, cette information étant donnée par le χ^2 . Plus la valeur du χ^2 est faible, meilleure est l'adéquation entre la déconvolution et le spectre RMN. Pour ce travail, le pourcentage de gaussienne varie entre 0 et 40 % en fonction de l'allure du pic. Plus le pic est fin, moins le coefficient de gaussienne est élevé.

Une fois les calculs effectués, le pourcentage de l'aire de chaque pic est déterminé. A partir de ces données, il est possible de déterminer un pourcentage d'isotacticité ou de syndiotacticité grâce aux équations suivantes ⁵ :

$$\% \text{ isotacticité} = \frac{\text{Aire } mm + 1/2(\text{Aire } rm + \text{Aire } mr)}{\text{Aire totale}}$$

$$\% \text{ syndiotacticité} = \frac{\text{Aire } rr + 1/2(\text{Aire } rm + \text{Aire } mr)}{\text{Aire totale}}$$

Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 23.

Tableau 23 : Résultats de l'étude de tacticité

Monomère	Voie de synthèse	Aire <i>rr</i> (%)	Aire <i>rm</i> (%)	Aire <i>mr</i> (%)	Aire <i>mm</i> (%)	% isotacticité	% syndiotacticité
RS-MLABe	Chimique	27	21	31	20	46%	54%
R-MLABe	Chimique	14	19	14	53	69%	31%
RS-MLABe	Enzymatique	28	20	28	24	48%	52%
R-MLABe	Enzymatique	15	0	41	44	65%	35%

Les résultats du Tableau 23 confirment les premières suppositions émises. Les polymères obtenus à partir du RS-MLABe présentent un caractère atactique quelle que soit la voie de synthèse utilisée. De plus, les polymères obtenus à partir du R-MLABe présentent, quant à eux, un caractère isotactique. Ce dernier est inférieur à 100 % peut-être en raison, d'une part, d'un excès énantiomérique inférieur à 100% du R-MLABe et, d'autre part, à une éventuelle racémisation partielle du carbone asymétrique lors de la réaction de polymérisation.

3. Conclusions

L'étude de la tacticité du PMLABe a permis d'infirmer les différentes structures hypothétiques avancées jusque-là. En effet, si le polymère obtenu par voie enzymatique à partir du monomère racémique présentait une structure en bloc (première hypothèse, Figure 37, page 107), alors le pourcentage d'isotacticité devrait être bien supérieur à 50 %. Par contre, si le polymère obtenu par voie enzymatique à partir du monomère racémique présentait une structure alternée (deuxième hypothèse, Figure 44, page 116), alors le pourcentage de syndiotacticité devrait être bien supérieur à 50 %. Ici, les pourcentages d'isotacticité et de syndiotacticité étant d'environ 50 %, aucune des structures avancées n'est possible.

Les études sur la structure primaire des différents PMLABe ne donnent pas de résultats concluants. Il est possible que les différences observées sur les températures de fusion des PMLABe obtenus par polymérisation enzymatique traduisent plutôt des structures secondaires particulières de certains polymères (hélices, feuillets).

Des analyses de dichroïsme circulaire ont été envisagées pour tenter de mettre en évidence ces structures secondaires mais elles n'ont pu être réalisées à l'heure actuelle. De plus, une analyse aux rayons X a également été considérée.

Ainsi, les études cinétiques et structurales menées jusqu'à aujourd'hui n'ont pas permis d'expliquer les différences physico-chimiques entre les polymères synthétisés par voie chimique et ceux obtenus par voie enzymatique.

Toutefois, le mécanisme de la polymérisation enzymatique du MLABe n'ayant jamais été décrit, il est possible que les caractéristiques physico-chimiques particulières des polymères obtenus par cette méthode puissent trouver une explication grâce à la compréhension du mécanisme réactionnel.

III. Etudes mécanistiques

A notre connaissance, la littérature ne décrit pas les mécanismes mis en jeu lors de la polymérisation enzymatique de lactones substituées. Par contre, le mécanisme de polymérisation par ouverture de cycle de lactones non-substituées a été décrit par de nombreuses équipes⁶⁻⁹.

1. Polymérisation par ouverture de cycle des lactones non-substituées par des lipases

La première étape de ce mécanisme est l'ouverture du cycle de la lactone (Figure 53) par la lipase. Dans le site actif de l'enzyme, la sérine activée de la triade catalytique attaque le carbonyle de la lactone. Un intermédiaire tétraédrique est formé, puis la reformation de la double liaison carbone-oxygène provoque l'ouverture de la lactone. Un acyle-enzyme est formée.

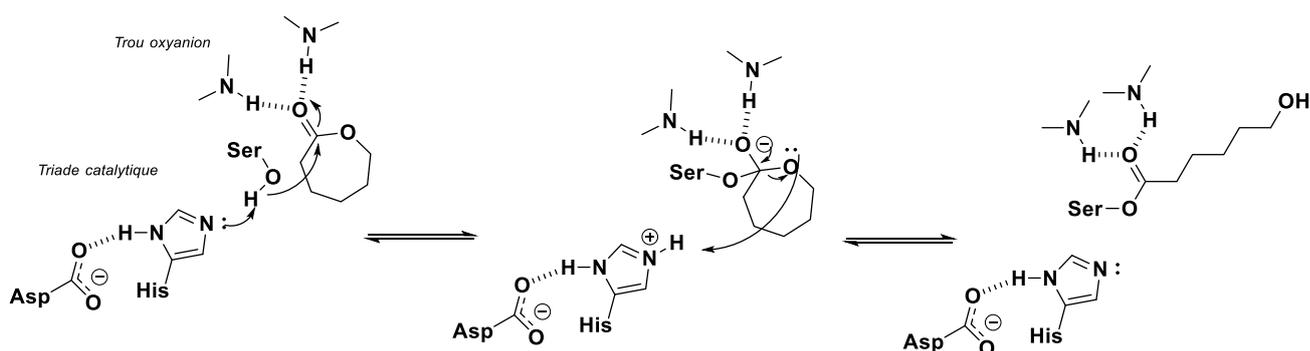


Figure 53 : Mécanisme de l'ouverture de l' ϵ -caprolactone par une lipase¹⁰

Ensuite, trois possibilités existent pour la dé-acylation de l'enzyme. Johnson *et al*⁶ ont modélisé la cinétique de polymérisation de l' ϵ -caprolactone par la lipase B de *Candida antarctica*. Ces auteurs ont présenté les trois possibilités de dé-acylation de l'enzyme (Figure 54).

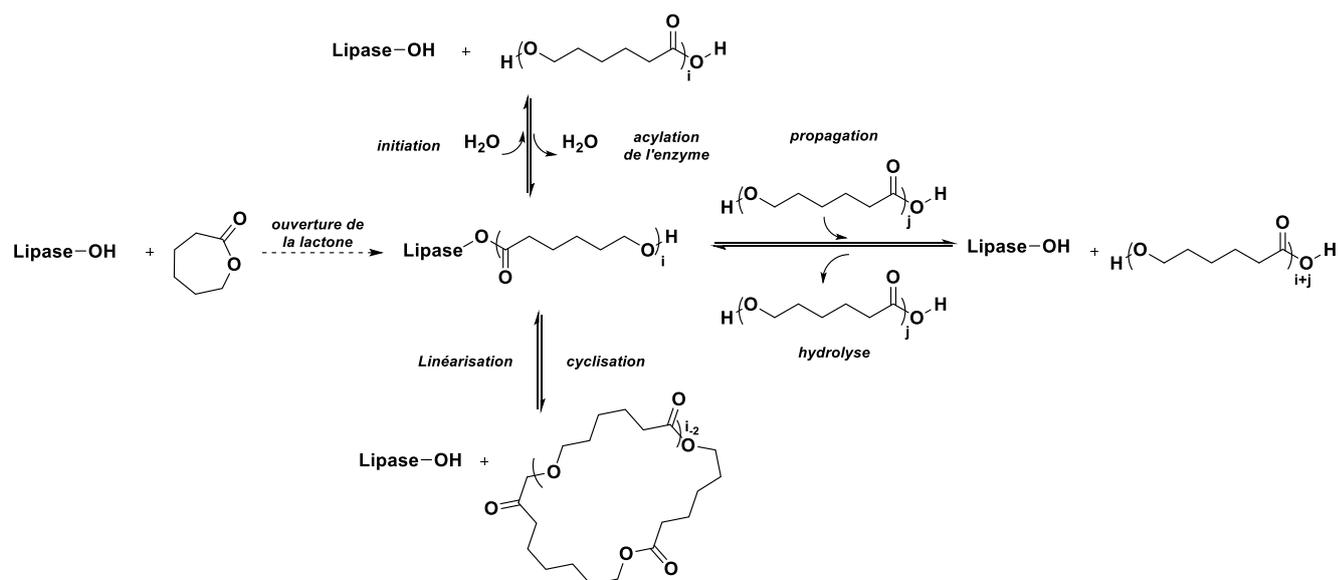


Figure 54 : Réactions possibles lors de la polymérisation enzymatique de l' ϵ -caprolactone ⁶

- L'initiation : l'amorceur (ici l'eau) attaque le complexe enzyme-substrat conduisant à la formation d'un monomère ouvert activé. A l'inverse, la formation d'un complexe enzyme-substrat peut être observée lorsque la fonction acide terminale du monomère ou du polymère en croissance réagit avec la sérine catalytique.
- La propagation : un monomère ou un polymère en croissance attaque le complexe enzyme-substrat provoquant la croissance de la chaîne macromoléculaire. A l'inverse, la lipase peut hydrolyser une fonction ester du polymère de façon aléatoire, formant ainsi deux polymères de plus petits degrés de polymérisation.
- La cyclisation : la fonction alcool terminale du polymère réagit avec la fonction ester liant la lipase au polymère. A l'inverse, la lipase peut hydrolyser une fonction ester d'un polymère cyclique, linéarisant ainsi la chaîne macromoléculaire.

Les différentes étapes proposées pour le mécanisme de polymérisation par ouverture de cycle des lactones suivent exactement le mécanisme canonique décrit dans l'introduction bibliographique.

Pour savoir si le mécanisme de polymérisation du MLABe est en adéquation avec celui des lactones non-substituées, comme l' ϵ -caprolactone, une étude sur le type d'ouverture du cycle du MLABe par la lipase a été réalisée.

2. Mécanisme d'ouverture du MLABe par la lipase de pancréas de porc

Le mécanisme décrit précédemment pour une lactone non substituée fait l'état d'une attaque nucléophile de la sérine de la lipase sur le carbonyle de la lactone. Cette attaque, qui entraîne l'ouverture de la lactone, est dite *O*-acyle (notée 1 sur la Figure 55). L'autre possibilité d'ouverture de lactone est l'ouverture dite *O*-alkyle (notée 2 sur la Figure 55) : elle correspond à l'attaque d'un nucléophile sur le carbone asymétrique portant la chaîne latérale. Cette ouverture est observée lors de la polymérisation chimique du MLABe par le benzoate de tétraéthylammonium et d'autres types de carboxylates ¹¹.

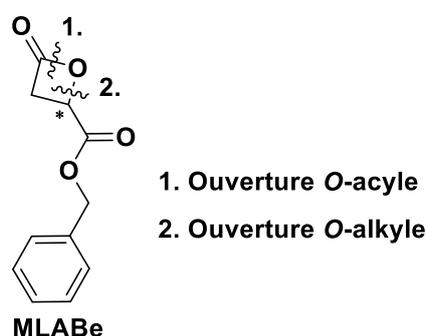


Figure 55 : Les deux types d'ouvertures possibles pour le MLABe

Pour déterminer le type d'ouverture pouvant avoir lieu lors de la polymérisation enzymatique, nous avons synthétisé des polymères à partir des monomères optiquement actifs du MLABe puis nous avons mesuré leur pouvoir rotatoire. En effet, si l'ouverture s'effectue en *O*-acyle, la configuration du carbone asymétrique ne sera pas impactée. Par contre, une inversion de configuration sera observée si l'ouverture s'effectue en *O*-alkyle. En hydrolysant le polymère obtenu et en comparant le pouvoir rotatoire de l'hydrolysate avec le monomère de départ, il est possible de mettre en évidence une inversion de configuration. Par contre, il faut s'assurer que l'hydrolyse ait lieu sans changer cette configuration.

Cette méthode a été utilisée par Guérin *et al.*, en 1986, pour déterminer le type d'ouverture du MLABe par la triéthylamine ¹². Dans cette étude, Guérin *et al.* ont synthétisé un polymère à partir du *R*-MLABe. Ce polymère a été ensuite hydrolysé avec de l'hydroxyde de potassium à 1 mol/L pendant 10 jours. L'hydrolysate obtenu, l'acide malique, a été analysé par polarimétrie. Les résultats ont montré que le polymère issu du *R*-MLABe était hydrolysé en acide *L*-malique (configuration *S* du carbone asymétrique). Un changement de configuration a donc été observé pendant la polymérisation, ce qui indique une ouverture *O*-alkyle du

MLABe en présence de la triéthylamine. Ce mécanisme est valable pour la polymérisation par ouverture de cycle du MLABe en présence de différents sels de carboxylates.

Nous avons à notre disposition un polymère optiquement actif synthétisé par voie chimique à partir du *R*-MLABe : il a donc servi de point de comparaison. En effet, si le pouvoir rotatoire du PMLABe obtenu par polymérisation enzymatique du *R*-MLABe a le même signe que celui du PMLABe obtenu par polymérisation chimique du *R*-MLABe, alors le mécanisme d'ouverture MLABe par voie chimique et enzymatique est identique.

Le Tableau 24 présente les résultats obtenus lors de la mesure des pouvoirs rotatoires par polarimétrie sur les différents polymères synthétisés.

Tableau 24 : Résultats des mesures de pouvoirs rotatoires des polymères synthétisés

Monomère	Voie de synthèse	c* (g/100 mL)	$[\alpha]_D^{25^\circ C}$
<i>R</i> -MLABe	Chimique	0,91	-11
<i>R</i> -MLABe	Enzymatique	0,74	-11
<i>S</i> -MLABe	Enzymatique	0,76	+18

*polymères solubilisés dans du chloroforme

Les polymères synthétisés à partir du *R*-MLABe ont des pouvoirs rotatoires identiques et de même signe quelle que soit la voie de synthèse ; le même type d'ouverture semble être observée dans les deux cas, à savoir, une ouverture *O*-alkyle.

Si ce résultat semble logique aux vues de la réactivité de la lactone, il l'est beaucoup moins si nous considérons le mécanisme réactionnel dans son ensemble. En effet, d'après la littérature, la sérine de la lipase doit réagir avec le carbonyle pour former un intermédiaire acyle-enzyme (liaison ester) qui est ensuite hydrolysé. Ici, si nous considérons l'attaque de la sérine sur le carbone asymétrique, nous obtiendrions un intermédiaire alkyle-enzyme (liaison éther) difficilement hydrolysable. Il semblerait donc que le mécanisme canonique décrit dans la littérature ne puisse pas s'appliquer dans notre cas.

Pour tenter de comprendre le mécanisme entrant en jeu dans notre polymérisation, des expériences complémentaires ont été menées. En s'inspirant des travaux de Coulembier *et al.* sur la polymérisation du lactide, un mime chimique de la triade catalytique de l'enzyme a été synthétisé et testé pour la polymérisation du MLABe¹³.

3. La triade catalytique synthétique

Dans cette publication ¹³, Coulembier *et al.* apportent des éléments de réponse pour le mécanisme de polymérisation du lactide. En effet, la lipase B de *Candida antarctica* est capable de polymériser le monomère D du lactide mais pas son énantiomère L, contrairement à la lipase de *Pseudomonas fluorescens* capable de polymériser les deux énantiomères. L'objectif de la création d'un mime de synthèse de la triade catalytique d'une lipase est de montrer que la non-polymérisation du L-lactide n'est pas due à un problème de réactivité de la triade, mais plutôt à la géométrie du site actif. La triade catalytique se compose de trois acides aminés (sérine, histidine et acide aspartique) stabilisés électroniquement entre eux par des liaisons hydrogène. Un sel de trifluoroacétate d'imidazolium mime le couple acide aspartique/histidine, et l'alcool primaire de la sérine est apporté par l'alcool benzylique qui sert d'amorceur (Figure 56).

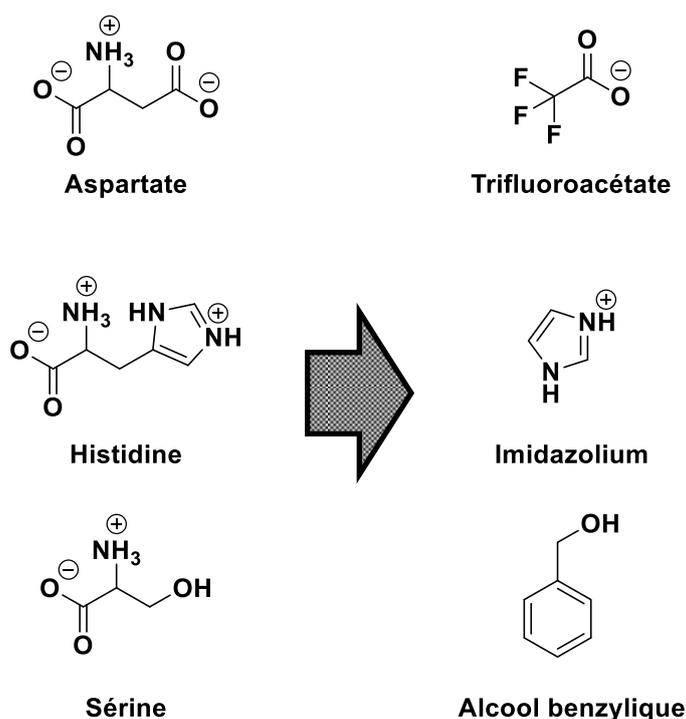


Figure 56 : La triade catalytique d'une lipase et son mime de synthèse ¹³

Cette triade a donc été utilisée pour polymériser le L-lactide. Sous atmosphère inerte, le L-lactide (1 eq.), l'alcool benzylique (0,014 eq.) et le sel de trifluoroacétate d'imidazolium (0,07 eq.) sont mélangés. La réaction a lieu à 140 °C pendant 2 h, sous agitation. Le taux de conversion, la masse molaire moyenne en nombre et la dispersité sont mesurés sur le brut

réactionnel par SEC. Le même protocole est utilisé en remplaçant le sel d'imidazolium par de l'imidazole avec toujours l'alcool benzylique comme amorceur.

Le Tableau 25 regroupe les résultats de ces deux expériences :

Tableau 25: Résultats de la polymérisation du L-lactide par le mime de la triade catalytique¹³

Amorceur	Taux de conversion	\overline{M}_n (g/mol)	D
Sel de trifluoroacétate d'imidazolium	60 %	6100	1,14
Imidazole	70 %	7100	1,78

La triade catalytique de synthèse est capable de polymériser le L-lactide, ce qui indiquerait que le problème de réactivité de la lipase B de *Candida antarctica* viendrait de la structure de l'enzyme et non du cœur catalytique.

L'imidazole seul est également capable de polymériser le L-lactide, mais le contrôle de la réaction est moins bon (dispersité de 1,78 contre 1,14 pour le sel).

En suivant cet exemple, un sel de trifluoroacétate d'imidazolium a été formé en solubilisant l'imidazole (1 eq.) dans du chloroforme puis en ajoutant, goutte à goutte à 0 °C, l'acide trifluoroacétique (TFA) (2,2 eq.). Après 24 h d'agitation, le sel précipité est purifié.

La réaction entre le MLABe et le mime de triade catalytique, complète ou partielle, est réalisée à 60 °C et à 390 rpm (conditions similaires à celles de la polymérisation enzymatique).

Cinq conditions de polymérisation ont été testées :

- (i) MLABe (1 eq.) et la triade catalytique de synthèse complète (alcool benzylique (0,04 eq.) et sel d'imidazolium (0,2 eq.))
- (ii) MLABe (1eq) et le sel d'imidazolium (0,2 eq.)
- (iii) MLABe (1 eq.) et l'alcool benzylique (0,04 eq.)
- (iv) MLABe (1 eq.) et l'acide trifluoroacétique (0,2 eq.)
- (v) MLABe (1 eq.) et l'imidazole (0,2 eq.).

Au bout de 3 h, la réaction est stoppée par l'ajout de 5 volumes de chloroforme permettant de solubiliser le mélange réactionnel. Le polymère est purifié en suivant le protocole décrit précédemment. Le taux de conversion et le taux d'hydrolyse sont déterminés par RMN ¹H,

tandis que la dispersité et la masse molaire moyenne en masse sont déterminées par SEC dans le THF en utilisant des standards polystyrènes.

Le Tableau 26 regroupe les résultats obtenus lors de ces polymérisations

Tableau 26 : Résultats de la polymérisation du MLABe en utilisant le mime de la triade catalytique

Entrées	Taux de conversion	Taux d'hydrolyse	\overline{M}_w (g/mol)	D
(i)	100 %	0 %	600	1,4
(ii)	100 %	0 %	500	1,4
(iii)	0 %	0 %	---	---
(iv)	0 %	0 %	---	---
(v)	100 %	0 %	3 350	1,5

Le mime de la triade catalytique est capable de polymériser le MLABe dans les conditions utilisées (entrée (i)), toutefois les masses molaires obtenues sont faibles et éloignées de la valeur théorique (600 g/mol contre 5 150 g/mol, calculé à partir du ratio monomère/amorceur avec l'alcool benzylique comme amorceur). Contrairement à la publication, aucune boîte à gant n'a été utilisée et la présence de traces d'eau (autre amorceur possible de la polymérisation) est possible. Cette hypothèse est confirmée par l'entrée (iii) puisqu'en absence d'alcool benzylique, amorceur de la polymérisation, la réaction a quand même lieu. De plus, les résultats étant sensiblement les mêmes avec ou sans alcool benzylique il est probable que son rôle soit mineur comparé à celui de l'eau. En présence uniquement d'alcool benzylique (entrée (iii)) ou d'acide trifluoroacétique (entrée (iv)), la polymérisation n'a pas lieu (taux de conversion nul). Par contre, l'imidazole (entrée (v)) est capable, à lui seul, de polymériser le MLABe de manière efficace (taux de conversion de 100 % et polymères ayant des masses molaires de 3 350 g/mol ($\overline{M}_{w,th} = 5\ 150$ g/mol) avec une dispersité de 1,5).

Dans cette expérience, l'imidazole était le pendant « synthétique » de l'histidine de la triade catalytique de la lipase. A partir des résultats obtenus, il semble logique de se demander si l'histidine seule est capable de polymériser le MLABe, sans l'intervention de la sérine et donc du mécanisme canonique.

Un mécanisme acide-base, excluant la sérine, serait donc envisageable. En effet, ce genre de mécanisme a déjà été décrit pour la lipase de pancréas de porc lors de la réaction d'aldolisation entre un aldéhyde et une cétone en présence d'eau¹⁴. Par ailleurs, la

littérature relate une ouverture *O*-alkyle des lactones non substituées lorsqu'elles sont polymérisées en présence d'une base faible comme amorceur. L'ion carboxylate formé serait alors l'espèce responsable de la propagation¹⁵⁻¹⁷. Cependant, la formation d'un carboxylate dans ce cas proviendrait de réactions secondaires, notamment de déprotonations du monomère ou du polymère en croissance¹⁶. En effet, Kricheldorf *et al.* ont montré que les amorceurs basiques, tels qu'une amine tertiaire ou un alcoolate, pouvaient arracher un des deux protons « acides » du cycle lactonique en α du carbonyle pour former l'acrylate correspondant (Schéma 3). Cet acrylate continuerait la polymérisation des monomères restants pour conduire à un polymère terminé, à une de ces extrémités, par une double liaison¹⁶.

Par ailleurs, Guérin *et al.* ont montré que ces réactions de déprotonation ont aussi lieu lors de la polymérisation anionique de malolactonates d'alkyle¹⁸.

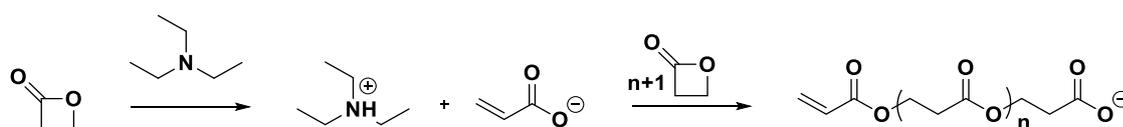


Schéma 3 : Mécanisme supposé de la polymérisation par ouverture de cycle de la β -propiolactone¹⁶

Si nous prenons en compte cette réaction de déprotonation dans les cas de polymérisation enzymatique du MLABe, la première étape du mécanisme consisterait en un arrachement d'un proton acide en α de la fonction lactonique par l'azote basique de l'imidazole (Figure 57, A). Le carboxylate ainsi formé poursuivrait alors la polymérisation des MLABe restants. Par conséquent, si les protons acides du MLABe sont remplacés par des groupements méthyles, ce qui est le cas pour le diméthyl-MLABe, alors cette première étape ne pourrait plus avoir lieu et la polymérisation ne démarrerait pas (Figure 57, B).

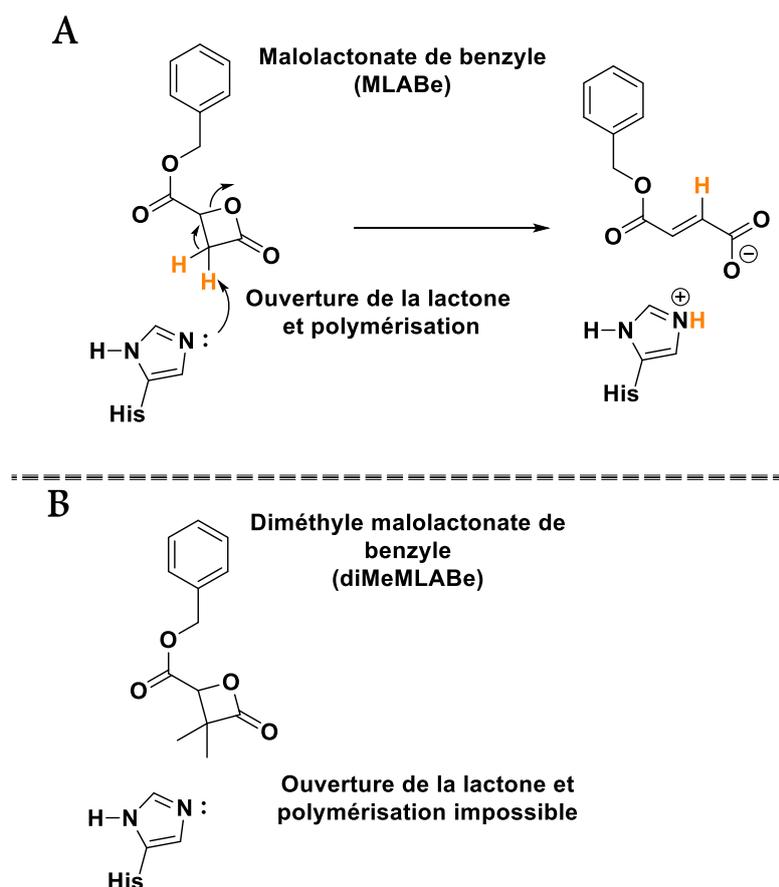


Figure 57 : Première étape hypothétique de l'ouverture de la lactone

La polymérisation enzymatique du diméthyle malolactonate de benzyle (diMeMLABe) a été réalisée en utilisant le protocole optimisé pour la polymérisation du malolactonate de benzyle (MLABe). La lipase de pancréas de porc (PPL) solubilisée dans du tampon Tris/HCl (105 mM, pH 7) a été mélangée avec le diMeMLABe (ratio PPL/diMeMLABe 1/40). La réaction se déroule à 60 °C, sous agitation pendant 72 h. Une fois la réaction terminée, le mélange est transféré dans une ampoule à décanter. Après séparation, la phase organique est concentrée sous pression réduite.

L'analyse du spectre RMN ^1H montre qu'aucune réaction de polymérisation n'a eu lieu. En effet, aucun pic caractéristique d'un polymère n'est observé (Figure 58). De plus, le diMeMLABe n'a pas été dégradé. En effet, les spectres avant et après polymérisation sont superposables, seul un pic résiduel d'eau est observé, dû à la méthode de purification.

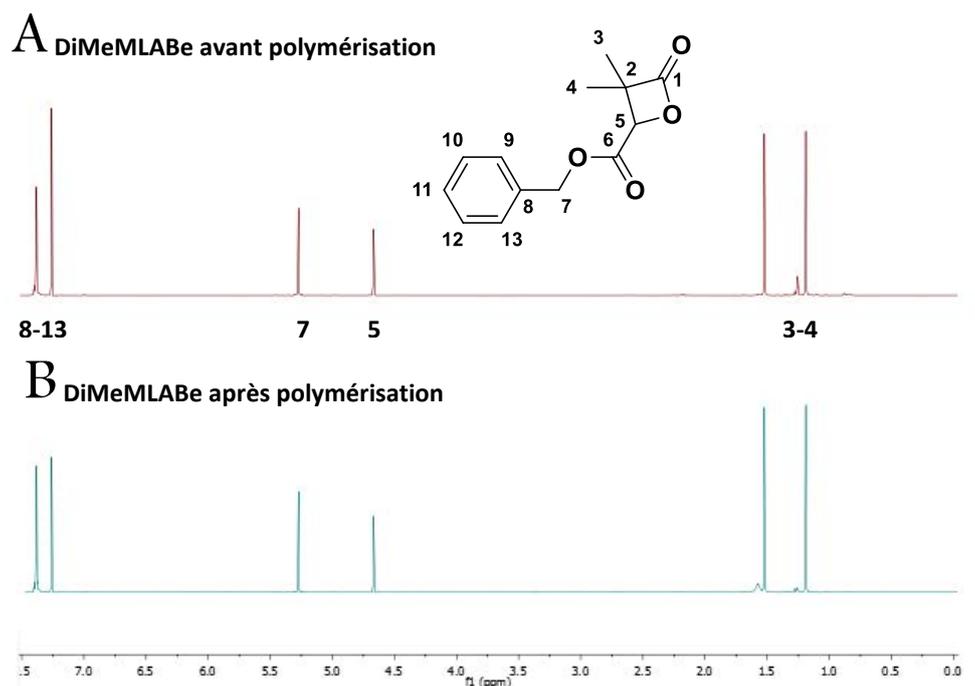


Figure 58 : Superposition des spectres RMN de la diMeMLABe (A) avant et (B) après polymérisation

L'impossibilité de polymériser le diMeMLABe à l'aide de la lipase pancréatique de porc renforce notre hypothèse, mais ne la vérifie pas complètement. En effet, il est possible que la non-polymérisation du diMeMLABe soit due à l'encombrement stérique de ce monomère l'empêchant de rentrer dans le site actif de l'enzyme. Une modélisation de docking entre la lipase et les deux lactones permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Un mutant de lipase de pancréas de porc dans lequel la sérine catalytique est remplacée par l'alanine est en cours de production dans l'équipe du Professeur Dubreucq à Montpellier. Ce mutant permettra de déterminer les rôles respectifs de la sérine et de l'histidine. En effet, si la réaction de polymérisation n'a pas lieu, alors nous pourrions conclure que la sérine joue un rôle fondamental dans la polymérisation enzymatique du MLABe. Par contre, si la réaction de polymérisation a lieu, alors l'hypothèse d'un mécanisme acide-base avec l'histidine se confirmerait.

En attendant les résultats de la polymérisation avec ce mutant, d'autres expériences ont été menées, toujours dans le but de cerner plus précisément le rôle de l'enzyme.

4. Autres hypothèses possibles

Une autre hypothèse envisagée est que l'enzyme catalyse l'ouverture de la lactone (en utilisant le mécanisme canonique), puis que ce monomère ouvert sert d'amorceur chimique à la polymérisation. Ainsi, la première ouverture se ferait en *O*-acyle, puis la réaction de propagation aurait lieu par ouverture du cycle lactonique en *O*-alkyle par le groupement carboxylate : ceci expliquerait le changement de configuration des carbones asymétriques au cours de la polymérisation.

Les travaux de stage de master 2 de Pierre Palomar-Ortiz permettent d'envisager cette hypothèse. En effet, des essais de polymérisation ont été menés avec le MLABe et le MLABe après ouverture du cycle. Ce monomère ouvert, l'acide 3-hydroxy-4-oxo-4-benzyloxybutanoïque (β -malate de benzyle) (Figure 59) a été synthétisé à partir de l'acide malique¹⁹.

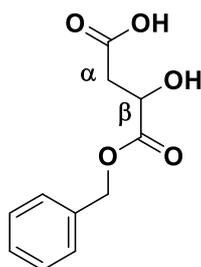


Figure 59 : Structure du β -malate de benzyle

La polymérisation a été effectuée en mélangeant, le MLABe (1 eq.) et le β -malate de benzyle (0,2 eq.) dans du tampon Tris/HCl (105mM, pH 7) sans aucune enzyme. Après 72 h à 60 °C, la réaction est stoppée et le polymère purifié. Le taux de conversion obtenu est de 98 %. La réaction de propagation peut donc avoir lieu sans la présence de l'enzyme, mais celle-ci est nécessaire à l'amorçage de la réaction pour ouvrir le premier monomère et former l' β -malate de benzyle. Les analyses SEC sont en cours afin de caractériser les oligomères ainsi formés.

Les résultats précédents sur les pouvoirs rotatoires des polymères synthétisés à partir des monomères chiraux (Figure 42) nous renseignent sur le type d'ouverture qui a lieu majoritairement lors de la polymérisation. Cependant, nous ne savons pas ce qu'il se passe dans les premiers instants de la polymérisation lors de l'amorçage.

Des essais ont été menés pour tenter de répondre à cette question. Des tri et tétramères ont été synthétisés par voie enzymatique à partir du *R*-MLABe. Ils ont été ensuite hydrolysés en utilisant la méthode décrite par Lenz et al.²⁰, méthode n'affectant pas la configuration du centre asymétrique. En mesurant l'excès énantiomérique après hydrolyse, il est possible de savoir si une racémisation a eu lieu lors de la réaction de polymérisation.

Les conditions expérimentales pour synthétiser ces oligomères ont été obtenues en utilisant le plan d'expérience. La lipase de pancréas de porc (ratio massique 1/10 PPL/MLABe), solubilisée dans du tampon Tris/HCl (105 mM, pH 7) est mélangée avec le MLABe (1,47 mol/L dans du toluène). Nous avons fait varier la température et la vitesse d'agitation en fonction de la nature de l'oligomère recherché. Après 72 h, la réaction est stoppée et l'oligomère est purifié en suivant le protocole décrit précédemment. Les taux de conversion et d'hydrolyse ont été déterminés par RMN ¹H, et les masses molaires moyennes en masses et la dispersité ont été mesurées par SEC.

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 27 :

Tableau 27 : Résultats de la synthèse d'oligomères

Monomère	Nombre d'unités théoriques	Taux de conversion	Taux d'hydrolyse	$\overline{M}_{w,th}$ (g/mol)	\overline{M}_w (g/mol)	Đ
<i>RS</i> -MLABe	3	100%	10%	618	700	1,4
<i>R</i> -MLABe	3	100%	11%	618	700	1,4
<i>RS</i> -MLABe	4	100%	6%	824	800	1,4
<i>R</i> -MLABe	4	100%	5%	824	750	1,4

Les oligomères souhaités ont bien été synthétisés : les masses molaires moyennes en masse sont en adéquation avec les résultats attendus et la conversion est totale. Le taux d'hydrolyse est, par contre, légèrement plus élevé que de coutume, mais cela ne devrait pas occasionner de gêne pour la suite de l'expérience puisque les oligomères seront hydrolysés.

Les oligomères sont ensuite méthanolysés en suivant un protocole mis en place par Lenz et al. pour un polymère de *S*-β-butyrolactone²⁰. Dans un tube Pyrex, l'oligomère dissous dans du chloroforme, est mélangé à une solution d'acide sulfurique (5%) dans du méthanol. Le mélange est chauffé dans un bain d'huile pendant 4h à 140 °C.

Les oligomères racémiques servent de référence pour séparer les deux énantiomères. Un test a également été réalisé avec le *S*-malate de diméthyle (produit de la méthanolyse, Figure 60) pour s'assurer qu'il n'y a pas de racémisation durant la méthanolyse.

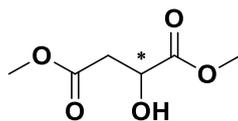


Figure 60 : Structure du malate de diméthyle

Les spectres RMN des hydrolysats montrent que l'hydrolyse des oligomères est bien complète. Les échantillons sont ensuite passés en chromatographie chirale pour déterminer l'excès énantiomérique.

Les analyses sont actuellement en cours.

5. Conclusions

Trois mécanismes ont été envisagés (Figure 61):

- *Le mécanisme canonique de la lipase* : la sérine activée par les liaisons hydrogène au sein du site catalytique de l'enzyme attaque le carbonyle de la fonction lactone. La lactone s'ouvre, un intermédiaire acyle-enzyme est formé. Cet intermédiaire est ensuite hydrolysé soit par l'eau (amorçage), soit par un polymère en croissance (propagation). Ce mécanisme ne peut pas avoir lieu pour l'une des raisons suivantes :
 - soit la sérine attaque le carbonyle de la lactone, alors l'ouverture de cette dernière se fait en *O*-acyle et la configuration du carbone asymétrique du monomère n'est pas changée. Cependant, les résultats sur les pouvoirs rotatoires des polymères synthétisés à partir des monomères optiquement actifs ont montré le contraire.
 - soit la sérine attaque le carbone asymétrique de la lactone, alors une liaison éther se forme entre l'enzyme et le MLABe, liaison qui ne peut être hydrolysée dans nos conditions de réaction.
- *L'ouverture du MLABe par un mécanisme acide-base et une propagation chimique* : l'histidine arracherait un des protons acides du MLABe en α du carbonyle provoquant ainsi son ouverture. Une fois le MLABe ouvert, la propagation se ferait par voie chimique comme l'ont démontré les expériences avec le MLABe et le β -malate de benzyle. Ce mécanisme serait cohérent avec les pouvoirs rotatoires des polymères issus des monomères chiraux. La littérature fait cas d'une réactivité similaire de

l'histidine catalytique pour des réactions d'aldolisation. Les résultats obtenus avec l'imidazole ainsi que la non-polymérisation du diMeMLABe conforte la probabilité de ce mécanisme.

- *L'ouverture du MLABe par le mécanisme canonique et une propagation chimique :* l'amorçage se ferait suivant le mécanisme canonique, puis, comme précédemment, la propagation se ferait par voie chimique à partir du monomère ouvert. Les résultats des tests sur l'hydrolyse des oligomères confirmeront ou infirmeront cette hypothèse. Cependant, ce mécanisme est peu probable car la polymérisation du diMeMLABe serait alors possible, or, nous avons montré le contraire.

Les essais de polymérisation avec le mutant sérine KO deviennent alors primordiaux, pour déterminer le mécanisme enzymatique. Si la polymérisation fonctionne, l'ouverture se ferait probablement grâce à un mécanisme acide-base par l'intermédiaire de l'histidine. Si, au contraire, les essais de polymérisation avec le mutant sérine KO ne fonctionnent pas, le mécanisme acide-base sera écarté et l'hypothèse de l'ouverture de la lactone par un mécanisme canonique prendrait de l'importance sans toutefois être validée.

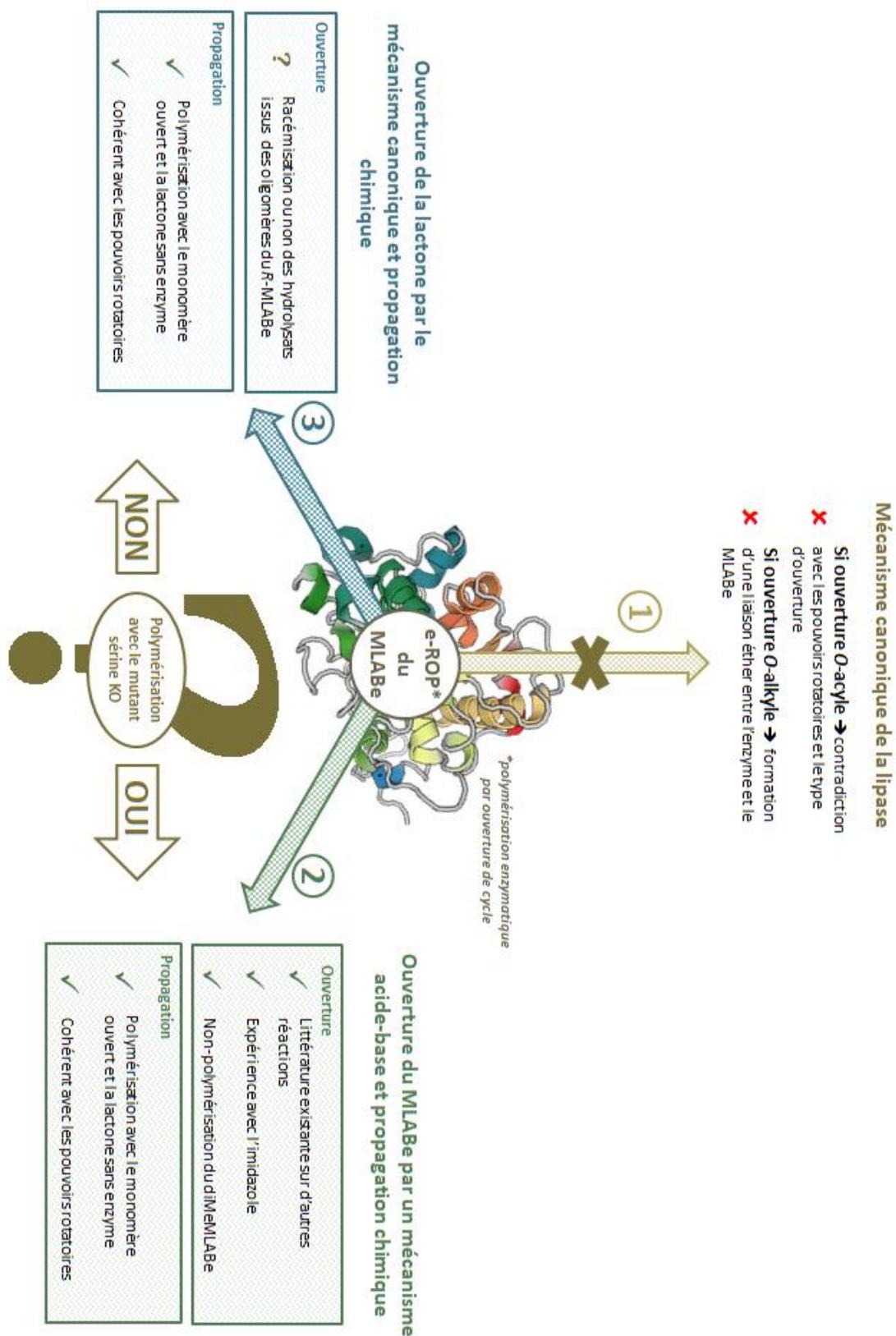


Figure 61 : Les différents mécanismes envisagés

IV. Conclusions

Les différentes études menées et décrites dans ce chapitre ont permis de caractériser plus en détails la polymérisation enzymatique du MLABe et les polymères obtenus. Ainsi, nous avons démontré que la lipase de pancréas de porc n'avait pas de préférence pour un des deux énantiomères du MLABe. La polymérisation des MLABe optiquement actifs, par la lipase de pancréas de porc, n'engendre pas de racémisation totale puisque les polymères issus de ces monomères possèdent eux-aussi un pouvoir rotatoire. La cinétique de polymérisation suit une cinétique d'ordre 1, et les polymères obtenus par voie enzymatique à partir du MLABe racémique sont atactiques mais présentent des températures de fusion, propriété caractéristique de polymères semi-cristallins. Cependant, il faut noter que leurs températures de fusion sont inférieures à celles mesurées pour les polymères synthétisés par voie chimique à partir de monomères optiquement actifs, mettant en évidence un taux de cristallinité moindre pour les polymères obtenus par voie enzymatique à partir de monomère racémique.

Toutefois, nous n'avons pas pu expliquer les températures de fusion observées pour les polymères obtenus par voie enzymatique à partir du mélange racémique. Des analyses de dichroïsme circulaire ou de balayage aux rayons X permettraient d'observer les structures secondaires et, peut-être, de mettre en évidence des différences de structuration en fonction de la voie de synthèse (enzymatique VS chimique).

Les études mécanistiques ont démontré que la polymérisation du MLABe par la lipase de pancréas de porc ne pouvait pas suivre totalement le mécanisme canonique décrit pour les polymérisations de lactones non substituées par des lipases en raison du type d'ouverture du cycle du MLABe.

Deux mécanismes restent possibles, et les essais complémentaires, avec le mutant sérine KO ainsi que les analyses des oligomères, devraient apporter des éléments supplémentaires pour étayer l'une ou l'autre des hypothèses.

Les différents polymères obtenus lors de ces études présentent des caractéristiques physico-chimiques différentes (température de fusion, masse molaire, tacticité). L'objectif applicatif de ces polymères étant la vectorisation de principes actifs, il est important d'étudier les effets de ces différences via des tests *in vitro*. Dans le chapitre 3, des tests de toxicité (aigüe

et chronique) et de captation ont donc été menés pour comparer les différents nano-objets préparés à partir des PMLABe obtenus.

Références bibliographiques

- (1) Palomo, J. M. Lipases Enantioselectivity Alteration by Immobilization Techniques. *Curr. Bioact. Compd.* **2008**, *4* (2), 126–138 DOI: 10.2174/157340708785294208.
- (2) Panova, A. A.; Taktak, S.; Randriamahefa, S.; Cammas-Marion, S.; Guerin, P.; Kaplan, D. L. Polymerization of Propyl Malolactonate in the Presence of *Candida Rugosa* Lipase. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (1), 19–27 DOI: 10.1021/bm0255746.
- (3) Allcock, H. R.; Lampe, F. W. Chap. 1 The Cope of Polymer Chemistry. In *Contemporary Polymer Chemistry 2nd Edition*; 1990; pp 71–72.
- (4) Jaffredo, C. G.; Chapurina, Y.; Kirillov, E.; Carpentier, J.-F.; Guillaume, S. M. Highly Stereocontrolled Ring-Opening Polymerization of Racemic Alkyl β -Malolactonates Mediated by Yttrium [Amino-Alkoxy-Bis(Phenolate)] Complexes. *Chem. – Eur. J.* **2016**, *22*, 7629–7641 DOI: 10.1002/chem.201600223.
- (5) Painter, P. C.; Coleman, M. M. *Fundamentals of Polymer Science: An Introductory Text*, 2nd ed.; Technomic Pub. Co: Lancaster, Pa, 1997.
- (6) Johnson, P. M.; Kundu, S.; Beers, K. L. Modeling Enzymatic Kinetic Pathways for Ring-Opening Lactone Polymerization. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (9), 3337–3343 DOI: 10.1021/bm2009312.
- (7) Matsumura, S. Enzymatic Synthesis of Polyesters via Ring-Opening Polymerization. In *Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers*; Kobayashi, S., Ritter, H., Kaplan, D., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2005; Vol. 194, pp 95–132.
- (8) Uyama, H.; Kobayashi, S. Enzymatic Ring-Opening Polymerization of Lactones Catalyzed by Lipase. *Chem. Lett.* **1993**, *22* (7), 1149–1150 DOI: 10.1246/cl.1993.1149.
- (9) Henderson, L. A.; Svirkin, Y. Y.; Gross, R. A.; Kaplan, D. L.; Swift, G. Enzyme-Catalyzed Polymerizations of ϵ -Caprolactone: Effects of Initiator on Product Structure, Propagation Kinetics, and Mechanism. *Macromolecules* **1996**, *29* (24), 7759–7766 DOI: 10.1021/ma960821h.
- (10) Shoda, S.; Uyama, H.; Kadokawa, J.; Kimura, S.; Kobayashi, S. Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (4), 2307–2413 DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00472.
- (11) Cammas, S. Le poly(acide β -malique) et ses dérivés: synthèse et caractérisation, Université Paris VI: Paris, 1993.
- (12) Guérin, P.; Francillette, J.; Braud, C.; Vert, M. Benzyl Esters of Optically Active Malic Acid Stereocopolymers as Obtained by Ring-Opening Polymerization of (R)-(+)- and (S)-(-)-Benzyl Malolactonates. In *Macromolecular Symposia*; Wiley Online Library, 1986; Vol. 6, pp 305–314.
- (13) Coulembier, O.; Josse, T.; Guillerme, B.; Gerbaux, P.; Dubois, P. An Imidazole-Based Organocatalyst Designed for Bulk Polymerization of Lactide Isomers: Inspiration from Nature. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (95), 11695 DOI: 10.1039/c2cc37061a.
- (14) Li, C.; Feng, X.-W.; Wang, N.; Zhou, Y.-J.; Yu, X.-Q. Biocatalytic Promiscuity: The First Lipase-Catalysed Asymmetric Aldol Reaction. *Green Chem.* **2008**, *10* (6), 616–618 DOI: 10.1039/B803406K.
- (15) Albertsson, A.-C.; Varma, I. K. Recent Developments in Ring Opening Polymerization of Lactones for Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (6), 1466–1486 DOI: 10.1021/bm034247a.
- (16) Kricheldorf, H. R.; Scharnagl, N.; Jedlinski, Z. Polylactones 33. The Role of Deprotonation in the Anionic Polymerization of β -Propiolactone. *Polymer* **1996**, *37* (8), 1405–1411.
- (17) Hofman, A.; Słomkowski, S.; Penczek, S. Structure of Active Centers and Mechanism of the Anionic Polymerization of Lactones. *Makromol. Chem.* **1984**, *185* (1), 91–101 DOI: 10.1002/macp.1984.021850110.
- (18) Mabile, C.; Masure, M.; Hémeury, P.; Guérin, P. Obvious Complexity of the Anionic Polymerization of Malolactonic Acid Esters. *Polym. Bull.* **1998**, *40* (4–5), 381–387 DOI: 10.1007/s002890050266.
- (19) Cammas, S.; Renard, I.; Boutault, K.; Guérin, P. A Novel Synthesis of Optically Active 4-Benzyloxy- and 4-Alkyloxycarbonyl-2-Oxetanones. *Tetrahedron Asymmetry* **1993**, *4* (8), 1925–1930 DOI: 10.1016/S0957-4166(00)80433-4.
- (20) Zhang, Y.; Gross, R. A.; Lenz, R. W. Stereochemistry of the Ring-Opening Polymerization of (S)-. Beta.-Butyrolactone. *Macromolecules* **1990**, *23* (13), 3206–3212.

Experimental Part Chapter 2

I. General conditions

1. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy

NMR spectra are recorded on a Bruker Avance III 400 spectrometer operating at 400.13 MHz for ^1H , equipped with a BBFO probe with a Z-gradient coil and a GREAT 1/10 gradient unit. The standard temperature is adjusted to 298 K.

The zg30 Bruker pulse program was used for 1D standard ^1H NMR, with a TD of 64k, a relaxation delay $d1 = 2$ s and 8 scans. The spectrum width was set to 18 ppm. Fourier transform of the acquired FID was performed without any apodization in most of the case. For polymers ^1H NMR spectra, relaxation delay $d1$ was set to 4 s given a repetition time between pulses of 8 s and 32 scans were performed.

^{13}C NMR spectra were recorded at 100.61 MHz. Several sequences as zgpg30 were usually used with 64 to 1,024 scans depending on the concentration of the sample. TD is 64k and a relaxation delay of 2 s for a spectral width of 220 ppm were used. Fourier transform was performed after apodization with an exponential function using a LB of 0.6 Hz.

The inverse gate Bruker pulse program (zgig30) was used for the study of polymer tacticity with the following parameters: spectrum window of 250 ppm, acquisition time of 0.6 s, a relaxation delay of 12 s and a 1,024 scans were performed. Fourier transform was performed after apodization with an exponential function using a LB of 1 Hz.

The deconvolution module of the Bruker Topsin software was used to determine the respective areas of each triad for the tacticity studies. Normally, a Lorentzian was used to fit the line, a percentage of Gaussian (0 to 40 %) could be added depending of the shape of the pics.

2. Infrared spectroscopy

FT-IR spectra were recorded on an Avatar 320FT-IR Thermo Nicolet spectrometer between 500 and 4000 cm^{-1} by direct measure.

3. Size Exclusion Chromatography

Mass average molar mass (\overline{M}_w) and dispersity ($\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} = \mathcal{D}$) values were measured by size exclusion chromatography (SEC) in THF at 40 °C (flow rate = 1.0 mL/min) on a GPC2502 Viscotek apparatus

equipped with a refractive index detector Viscotek VE 3580 RI, a guard column Viscotek TGuard, Org 10x4.6mm, a LT5000L gel column (for samples soluble in organic medium) 300 x 7.8 mm and a GPC/SEC OmniSEC Software. The polymer samples were dissolved in THF (2 mg/mL). All elution curves were calibrated with polystyrene standards.

4. Differential Scanning Calorimetry

Glass transition temperatures (T_g) and melting temperatures (T_m) values were measured by differential scanning calorimetry (DSC). Measurements were acquired on a DSC Q2000 apparatus from TA Instruments under nitrogen flow at heating rate 10°C/min from -80 to 180 °C.

5. Polarimetry

Optical rotations were measured using a Perkin-Elmer 341 polarimeter with a sodium lamp (wavelength = 589 nm). Samples were dissolved in chloroform, ethyl acetate or 1,4-dioxane (concentration around 10 mg/mL) and transferred into the polarimeter microcell (length = 1 dm). Measures were performed at room temperature.

6. Chiral High Performance Liquid Chromatography

Enantiomeric excess (ee) was measured using a chiral column IA 250 x 4.6 mm at 25 °C in a HPLC alliance from Waters (detection at 254 nm and 220 nm). The mobile phase was a mixture of hexane and isopropyl alcohol (97/3) at 1 mL/min. Samples were prepared in hexane (1 mg/mL) and the injection volume was 10 μ L.

II. Synthesis route of R-MLABe (Figure 62)¹

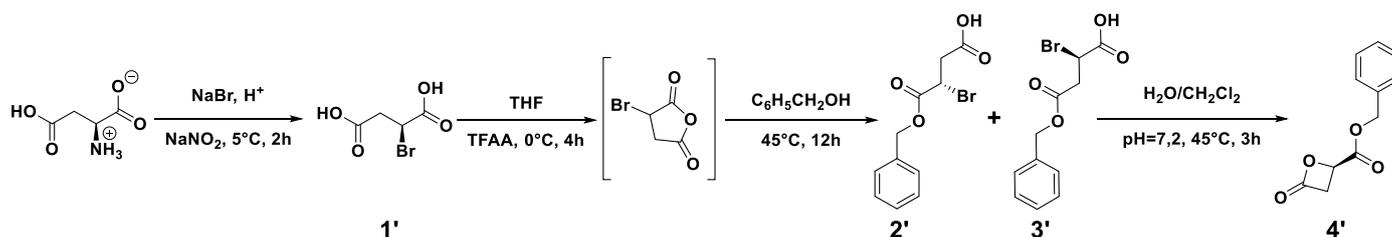
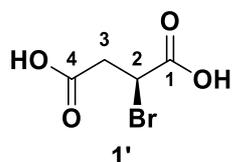


Figure 62 : Synthesis route of R-MLABe

1. Synthesis of S-bromosuccinic acid



Chemical Formula: $C_4H_5BrO_4$
Molecular Weight: 196.98

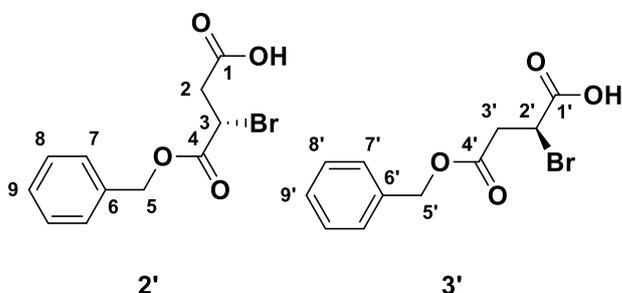
Protocol for the synthesis of S-bromosuccinic acid was the same as that used for the synthesis of RS-bromosuccinic acid, starting with L-aspartic acid. The protocol is described in the Experimental Part of the Chapter 1.

21.6 g of S-bromosuccinic acid were obtained starting from 20 g of L-aspartic acid (yield = 73%)

¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆): δ 4.64 (dd, *J* = 8.7, 6.2 Hz, 1H, H₂), 3.25 (dd, *J* = 17.2, 8.7 Hz, 1H, H_{3α}), 3.01 (dd, *J* = 17.2, 6.2 Hz, 1H, H_{3β}).

Polarimetry (ethyl acetate, T_{amb}, λ = 589nm, c = 0.01g/mL): [α]_D = -74.6

2. Synthesis of mixture of S-3-benzyloxycarbonyl-3-bromopropanoic acid and S-2-bromo-3-benzyloxycarbonylpropanoic acid¹



Chemical Formula: $C_{11}H_{11}BrO_4$
Molecular Weight: 287.11

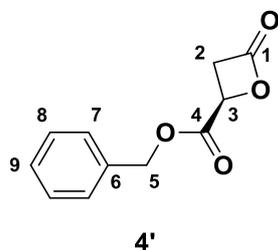
Protocol for the synthesis of S-3-benzyloxycarbonyl-3-bromopropanoic acid and S-2-bromo-3-benzyloxycarbonylpropanoic acid was the same as that used for the synthesis of RS-3-

benzyloxycarbonyl-3-bromopropanoic acid and *RS*-2-bromo-3-benzyloxycarbonylpropanoic acid and is described in the Experimental Part of the Chapter 1.

27.17 g of *S*-3-benzyloxycarbonyl-3-bromopropanoic acid and *S*-2-bromo-3-benzyloxycarbonylpropanoic acid were obtained starting from 20.57 g of *S*-bromosuccinic acid (yield = 94%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6): δ 7.50 – 7.15 (m, 5H, H_{Ar} and $\text{H}_{\text{Ar}'}$), 5.22 (d, 2H, H_5 73% of lactonizable compound 2'), 5.16 (s, 2H, H_5 27% of non-lactonizable compound 3'), 4.76 – 4.67 (m, 1H, H_3 and H_2'), 3.34 – 3.24 (m, 1H, $\text{H}_{2\alpha}$ and $\text{H}_{3'\alpha}$), 3.14 – 3.02 (m, 1H, $\text{H}_{2\beta}$ and $\text{H}_{3'\beta}$).

3. Synthesis of *R*-4-benzyloxycarbonyl-2-oxetanone ¹



Chemical Formula: $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_4$
Molecular Weight: 206.20

Protocol for the synthesis of *R*-4-benzylcarbonyl-2-oxetanone was the same as that used for the synthesis of *RS*-4-benzylcarbonyl-2-oxetanone and is described in the Experimental Part of the Chapter 1.

7.90 g of *R*-4-benzylcarbonyl-2-oxetanone were obtained starting from 27.17 g of *S*-3-benzyloxycarbonyl-3-bromopropanoic acid and *S*-2-bromo-3-benzyloxycarbonylpropanoic acid.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6): δ 7.47 – 7.28 (m, 5H, H_{Ar}), 5.27 (s, 2H, H_5), 5.11 (dd, $J = 6.7$, 4.4 Hz, 1H, H_3), 3.99 (dd, $J = 16.5$, 6.7 Hz, 1H, $\text{H}_{2\alpha}$), 3.72 (dd, $J = 16.5$, 4.4 Hz, 1H, $\text{H}_{2\beta}$).

FT-IR (ν , cm^{-1}): 1840 (C=O, lactone) 1750 (C=O, ester)

Polarimetry (chloroform, T_{amb} , $\lambda = 589\text{nm}$, $c = 0.01\text{g/mL}$): $[\alpha]_D = +15.2$

Enantiomeric excess: 93%

III. Synthesis route of S-MLABe (Figure 63) ¹

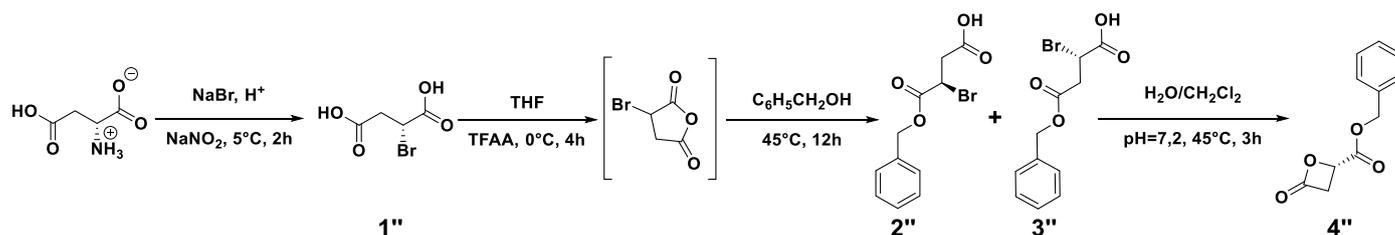
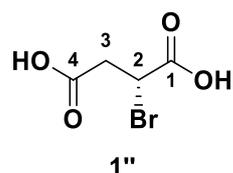


Figure 63 : Synthesis route of S-MLABe

1. Synthesis of R-bromosuccinic acid



Chemical Formula: $C_4H_5BrO_4$

Molecular Weight: 196.98

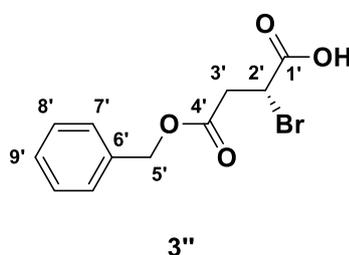
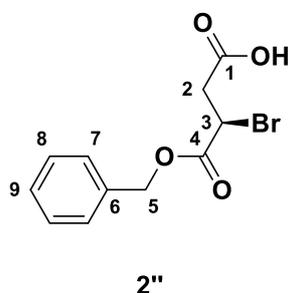
Protocol for the synthesis of R-bromosuccinic acid was the same as that used for the synthesis of RS-bromosuccinic acid, starting from D-aspartic acid. The protocol is described in the Experimental Part of the Chapter 1.

17.6 g of R-bromosuccinic acid were obtained starting from 20.4 g of D-aspartic acid (yield = 58%)

¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆): δ 4.64 (dd, *J* = 8.7, 6.2 Hz, 1H, H₂), 3.25 (dd, *J* = 17.2, 8.7 Hz, 1H, H_{3α}), 3.01 (dd, *J* = 17.2, 6.2 Hz, 1H, H_{3β}).

Polarimetry (ethyl acetate, T_{amb}, λ = 589nm, c = 0.01g/mL): [α]_D = +26

2. Synthesis of mixture of R-3-benzyloxycarbonyl-3-bromopropanoic acid and R-2-bromo-3-benzyloxycarbonylpropanoic acid ¹



Chemical Formula: $C_{11}H_{11}BrO_4$

Molecular Weight: 287.11

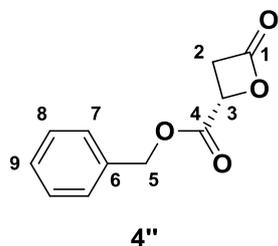
Protocol for the synthesis of R-3-benzyloxycarbonyl-3-bromopropanoic acid and R-2-bromo-3-benzyloxycarbonylpropanoic acid was the same as that used for the synthesis of RS-3-

benzyloxycarbonyl-3-bromopropanoic acid and *RS*-2-bromo-3-benzyloxycarbonylpropanoic acid and is described in the Experimental Part of the Chapter 1.

23.26 g of *R*-3-benzyloxycarbonyl-3-bromopropanoic acid and *R*-2-bromo-3-benzyloxycarbonylpropanoic acid were obtained starting from 17g of *R*-bromosuccinic acid (yield = 88%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6): δ 7.50 – 7.15 (m, 5H, H_{Ar} and $\text{H}_{\text{Ar}'}$), 5.22 (d, 2H, H_5 72% of lactonizable compound 2''), 5.16 (s, 2H, H_5 28% of non-lactonizable compound 3''), 4.76 – 4.67 (m, 1H, H_3 and H_2'), 3.34 – 3.24 (m, 1H, $\text{H}_{2\alpha}$ and $\text{H}_{3'\alpha}$), 3.14 – 3.02 (m, 1H, $\text{H}_{2\beta}$ and $\text{H}_{3'\beta}$).

3. Synthesis of *S*-4-benzyloxycarbonyl-2-oxetanone



Chemical Formula: $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_4$
Molecular Weight: 206.20

Protocol for the synthesis of *S*-4-benzylcarbonyl-2-oxetanone was the same as that used for the synthesis of *RS*-4-benzylcarbonyl-2-oxetanone and is described in the Experimental Part of the Chapter 1.

6.10 g of *S*-4-benzylcarbonyl-2-oxetanone were obtained starting from 21.91 g (yield = 39%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6): δ 7.47 – 7.28 (m, 5H, H_{Ar}), 5.27 (s, 2H, H_5), 5.11 (dd, $J = 6.7$, 4.4 Hz, 1H, H_3), 3.99 (dd, $J = 16.5$, 6.7 Hz, 1H, $\text{H}_{2\alpha}$), 3.72 (dd, $J = 16.5$, 4.4 Hz, 1H, $\text{H}_{2\beta}$).

FT-IR (ν , cm^{-1}): 1840 (C=O, lactone) 1750 (C=O, ester)

Polarimetry (chloroform, T_{amb} , $\lambda = 589\text{nm}$, $c = 0.01\text{g/mL}$): $[\alpha]_D = -12.5$

Enantiomeric excess: 72%

IV. Polymerization

1. Enzymatic polymerization ²

Polymerization in solution

The protocol use for these experiments was the same as the one described in the Experimental Part of the Chapter 1, regardless the nature of the monomer used (*RS*-MLABe, *R*-MLABe or *S*-MLABe).

For the kinetic studies, only the reaction time was changed. The reaction was stopped after 5h for the first point, 9h for the second point, 24h for the third point, 33h for the fourth point, 48h for the fifth point and 72h for the sixth and final point.

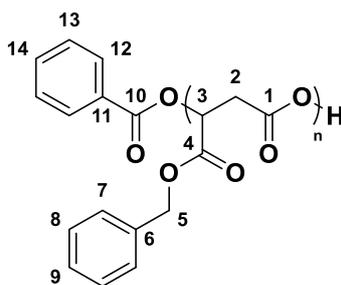
Polymerization without solvents

The protocol use for these experiments was the same as the one described in the Experimental Part of the Chapter 1, regardless the nature of the monomer used (MLABe or diMeMLABe).

2. Chemical polymerization

Polymerization using tetraethylammonium benzoate ³

Tetraethylammonium benzoate (initiator) was dried under vacuum for 24 h at room temperature. 45 mg ($1.77 \cdot 10^{-4}$ mol) of the initiator were put into 400 μ L of absolute ethanol freshly distilled. 225 μ L of the initiator ($6.85 \cdot 10^{-3}$ eq.) were placed in a 50 mL round-bottomed flask. The alcohol was then eliminated under vacuum at room temperature. The vacuum was broken under nitrogen atmosphere. 3 g (14.6 mmol, 1 eq. of the lactone (*RS*-MLABe (protocol synthesis described in the Experimental part of the chapter 1) or compound 4') were transferred under N₂ in the round-bottomed flask. The polymerization was conducted at 37 °C for 3 days. The polymer was dissolved in acetone (compound 4), one drop of concentrated HCl was added and the polymer was precipitated into ethanol. After elimination of the supernatant, the polymer was dried under vacuum at room temperature leading to 2.05 g of purified *RS*-poly(β -benzyl malate) (yield = 66 %).



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6): δ 7.57 – 7.19 (m, 5H, H_{Ar}), 5.67 – 5.46 (m, 1H, H_3), 5.38 – 4.92 (m, 2H, H_5), 3.17 – 2.73 (m, 2H, H_2).

FT-IR (ν , cm^{-1}): 1750 (C=O)

SEC (THF, 40 °C, 1 mL/min, polystyrene standards): $\overline{M}_w = 14,500 \text{ g/mol}$; $\text{Đ} = 1.6$;
 $\overline{M}_{w,th} = 30,000 \text{ g/mol}$

Polymerization using synthetic catalytic triad

Imidazolium trifluoroacetate salt synthesis

In a 250 mL round-bottomed flask, 505.1 mg (7.42 mmol, 1 eq.) of imidazole were dissolved in 50 mL of chloroform. The mix was cold to 0°C, then, 1.25 mL (16.32 mmol, 2.2 eq.) of trifluoroacetic acid (TFA) was added drop by drop. After 24 h under stirring, the precipitated salt was filtered, washed with chloroform and dried overnight at 80°C. 578 mg of imidazolium salt were obtained (yield = 43 %)

Melting point: $P_{m,ref} = 127.2 \text{ }^\circ\text{C}^4$, $P_{m,measured} = 128 \text{ }^\circ\text{C}$

Polymerization

Experiments were realized in a 24-multi reactor Büchi Syncore Line. In a 30 mL-tube, imidazolium salt and/or imidazole, and/or TFA, and/or benzyl alcohol (composition depending of the entry as shown by Table 2) were mixed with MLABe (200 mg, 0.97 mmol, 1eq.).

Table 2: Composition of the reactive mix

Entry	Imidazolium salt			Benzyl alcohol			TFA			Imidazole		
(i)	35.3 mg	0.194mmol	0.2 eq.	4 μ L	0.039 mmol	0.04 eq.	0			0		
(ii)	35.3 mg	0.194mmol	0.2 eq.	0			0			0		
(iii)	0			4 μ L	0.039 mmol	0.04 eq.	0			0		
(iv)	0			0			14.8 μ L	0.194 mmol	0.2 eq.	0		
(v)	0			0			0			13.2	0.194 mmol	0.2 eq.

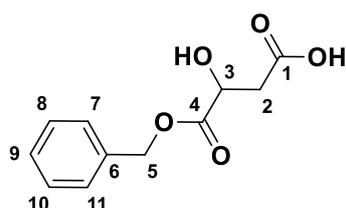
After 3 h at 60 °C and 390 rpm, reactions were stopped by the adding 5 mL of chloroform. Next the mixture was filtered and transferred in a separatory funnel. Separation was realized by adding 15 mL of distilled water and 15 mL of chloroform. The aqueous phase was extracted twice by 7 mL of chloroform. Organic phases were dried over MgSO₄ and filtered. Finally, chloroform was evaporated under vacuum.

Polymers were dissolved in chloroform. The chloroform solution of polymers was added, drop by drop, in a large excess of cold diethyl ether leading to the precipitation of the polymers. After elimination of the supernatant, polymers were dried under vacuum at room temperature.

Conversion and hydrolysis rates were determined by ¹H NMR. Mass average molar mass and dispersity were determined by Size Exclusion Chromatography (SEC) in THF using polystyrene standards. Melting point and glass transition temperature were measured by DSC.

Polymerization using 3-hydroxy-4-oxo-4-benzoyloxybutanoïque (β -benzyle malate)

3-hydroxy-4-oxo-4-benzoyloxybutanoïque (β -benzyle malate) synthesis ¹



Chemical Formula: C₁₁H₁₂O₅
Molecular Weight: 224,21

D,L-malic acid (10 g, $7.5 \cdot 10^{-2}$ mol) was placed in a 100 mL round-bottomed flask and cooled in an ice bath. Trifluoroacetic anhydride (TFAA) (2 eq., 0.15 mol, 1.25 mL) was slowly added and the suspension was stirred magnetically at 0 °C for 1 h, followed by 2 h at room temperature. The trifluoroacetic acid formed and TFAA in excess were removed by distillation under vacuum (3 mbar) to give the trifluoroacetate of malic acid anhydride as a white solid with a quantitative yield. This solid was dissolved in 8.2 mL of anhydrous benzyl alcohol (1 eq.). The mixture was stirred overnight at room temperature. The oil was dissolved in ethyl acetate (200 mL) and extracted with three portions of aqueous 1M NaHCO₃ (3 x 50 mL). The combined aqueous phases were washed with ethyl acetate and then acidified to pH=2 with HCl (1.2 N). The aqueous layer was extracted with three portions of ethyl acetate (3 x 50 mL). These latter organic phases were combined, washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated to lead to an orange oil (m = 11.12 g, yield = 65 %).

¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆): δ 7.46 – 7.29 (m, 5H, H_{Ar}), 5.19 (s, 2H, H₅), 4.59 (dd, *J* = 7.1, 4.7 Hz, 1H, H₃), 2.84 (dd, *J* = 16.1, 4.7 Hz, 1H, H_{2α}), 2.71 (dd, *J* = 16.1, 7.1 Hz, 1H, H_{2β}).

Polymerization

In a 30 mL tube, 110 mg (0.53 mmol, 1 eq.) of MLABe were mixed with 20 mg (0.09 mmol, 0.17 eq.) and 50 μL Tris/HCl buffer (105 mM, pH 7). After 72h at 60°C, the reaction was stopped by adding 5 mL of chloroform. Next, the mixture was filtered and transferred in a separatory funnel. Separation was realized by adding 15 mL of distilled water and 15 mL of chloroform. The aqueous phase was extracted two times by 7 mL of chloroform. Organic phases were dried over MgSO₄ and filtered. Finally, chloroform was evaporated under vacuum.

Conversion rate and hydrolysis rate were determined by ¹H NMR.

V. Experiments with MLABe oligomers

1. Synthesis of MLABe oligomers

In a 30 mL tube, 9.9 mg (trimers) or 9.3 mg (tetramers) of PPL solubilized in 667 μL of Tris/HCl buffer (105 mM, pH 7) were mixed with 333 μL of a solution of MLABe in toluene (1.47 mol/L). After 72h at 53 °C (trimers) or 56 °C (tetramers) and 460 rpm (trimers) or 420 rpm (tetramers), the reaction was stopped by adding 5 mL of chloroform. Next the mixture

was filtered and transferred in a separatory funnel. Separation was realized by adding 15 mL of distilled water and 15 mL of chloroform. The aqueous phase was extracted two times by 7 mL of chloroform. Organic phases were dried over MgSO_4 and filtered. Finally, chloroform was evaporated under reduced pressure.

Conversion rate and hydrolysis rate were determined by ^1H NMR. Mass average molar mass and dispersity were determined by Size Exclusion Chromatography (SEC) in THF using polystyrene standards.

2. Methanolysis of MLABe oligomers

In a 10 mL Pyrex tube, 15 mg of oligomers dissolved in 2.5 mL of chloroform were mixed with 2.5 mL of a H_2SO_4 (5 % v/v) solution in methanol. The mixture was heated in an external oil bath at 100 °C during 4 h. Subsequently, 1 mL of a NaCl solution (180 g/L) and 2.5 mL of chloroform were added, and this mixture was transferred to a separatory funnel. The two layers were separated, and the aqueous layer was extracted with chloroform. The organic phases were combined, washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 , with brine and then dried over MgSO_4 . The solvent was removed under reduced pressure.

VI. References

- (1) Cammas, S.; Renard, I.; Boutault, K.; Guérin, P. A Novel Synthesis of Optically Active 4-Benzyloxy- and 4-Alkyloxycarbonyl-2-Oxetanones. *Tetrahedron Asymmetry* **1993**, *4* (8), 1925–1930 DOI: 10.1016/S0957-4166(00)80433-4.
- (2) Casajus, H.; Tranchimand, S.; Wolbert, D.; Nugier-Chauvin, C.; Cammas-Marion, S. Optimization of Lipase-Catalyzed Polymerization of Benzyl Malolactonate through a Design of Experiment Approach. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134* (11) DOI: 10.1002/app.44604.
- (3) Cammas, S.; Renard, I.; Langlois, V.; Guerin, P. Poly(β -Malic Acid): Obtaining High Molecular Weights by Improvement of the Synthesis Route. *Polymer* **1996**, *37* (18), 4215–4220 DOI: 10.1016/0032-3861(96)00204-2.
- (4) Coulembier, O.; Josse, T.; Guillerm, B.; Gerbaux, P.; Dubois, P. An Imidazole-Based Organocatalyst Designed for Bulk Polymerization of Lactide Isomers: Inspiration from Nature. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (95), 11695 DOI: 10.1039/c2cc37061a.

Chapitre 3

Toxicité des nanoparticules à base des
PMLABe chimiques ou enzymatiques :
étude comparative

Chapitre 3 : Toxicité des nanoparticules à base des PMLABe chimiques ou enzymatiques : étude comparative

Depuis de longues années, les chercheurs essayent de développer des molécules thérapeutiques de plus en plus spécifiques. Leur objectif est d'améliorer l'effet thérapeutique des principes actifs tout en diminuant les doses administrées et les effets secondaires, en plus d'une simplification des protocoles d'administration. Cette recherche est basée sur le concept de « Magic Bullet » postulé par Paul Ehrlich ¹ au début du 20^{ème} siècle, concept qui a inspiré des générations de scientifiques pour l'élaboration de molécules ou d'assemblages moléculaires thérapeutiques de plus en plus efficaces.

Depuis la fin du 20^{ème} siècle, les progrès réalisés dans ce domaine sont significatifs et ont permis la conception de nanovecteurs ayant reçu l'agrément de la « Food and Drug Administration (FDA) » américaine, ou étant dans des phases pré-cliniques ou cliniques ²⁻⁷. Malgré ces avancées, de nombreux progrès restent encore à faire dans leur élaboration. La conception de nanovecteurs passent, dans un premier temps, par la définition d'un cahier des charges très strict auquel doivent répondre, non seulement, les nanovecteurs, eux-mêmes, mais aussi les matériaux les constituant. Ils doivent : (i) être (bio)compatibles et/ou (bio)dégradables ; (ii) être (bio)fonctionnels, facile d'utilisation, stérilisables, stables au stockage et obtenir l'agrément de mise sur le marché ; (iii) permettre l'encapsulation d'une quantité importante de principe actif ; (iv) conduire à la libération contrôlée du principe actif ; (v) avoir des caractéristiques de surface contrôlées pour diminuer au maximum leur reconnaissance par le système immunitaire, être capables de franchir les barrières biologiques et libérer le principe actif aux sites visés (cellules, tissus et/ou organes) grâce à la présence d'agents de ciblage (anticorps, peptides, vitamines) ⁸⁻¹⁰.

Ces nanovecteurs sont définis comme étant des nanoobjets capables de vectoriser *in vivo* des petites molécules, des gènes ou des peptides ¹¹. Ils peuvent prendre la forme de conjugués principe actifs – polymères ¹² (A, Figure 64), de nanoparticules ¹³ (B, Figure 64), de micelles ¹⁴ (C, Figure 64) ou de polymersomes ¹⁵ (D, Figure 64).

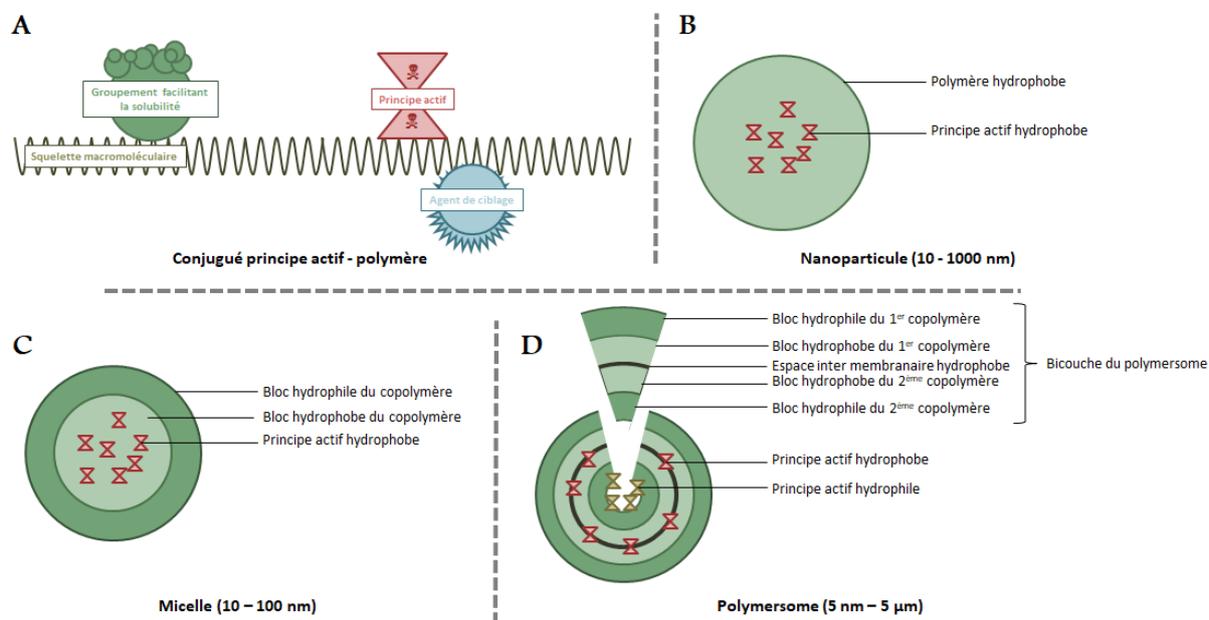


Figure 64 : Représentation schématique des différents nanovecteurs ¹²⁻¹⁶

Dans ce domaine, il est important de citer les travaux pionniers réalisés par Ringsdorf et Duncan. Ils ont élaboré les premiers conjugués principe actif – polymères basés sur le complexe poly(*N*-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide) – doxorubicine (anticancéreux), entré en phase I/II d'essais cliniques en 1994 ¹⁶⁻¹⁸. Par ailleurs, Kataoka *et al.* ^{17,19-23} et Kabanov *et al.* ^{17,24-27} ont été aussi les premiers à élaborer des micelles basées sur des copolymères à blocs amphiphiles et entrées en essais cliniques de phase I/II dans les années 1990 ¹⁷.

Depuis ces travaux, de nombreux nanovecteurs ont été, et continuent d'être, développés avec le même objectif : essayer de trouver le nanovecteur idéal permettant d'apporter la meilleure réponse thérapeutique à une maladie donnée ^{7,11,17,28}.

Dans ce contexte, plusieurs matériaux macromoléculaires (bio)stables ou (bio)dégradables sont synthétisés afin d'obtenir des (co)polymères portant diverses fonctionnalités, telles que des principes actifs ou des groupes modifiables permettant la fixation de principes actifs, de molécules de ciblage, de fonctions sensibles à un stimulus (changement des conditions de

pH, de potentiel redox, de température, etc), fonctionnalités devant être transférées aux nanovecteurs^{7,17,18}.

Le poly(acide- β -malique), PMLA, (Figure 65) occupe une place de choix parmi les (co)polymères développés, dans le sens où ce polyester est dégradable, par hydrolyse chimique ou enzymatique, en acide malique, molécule non toxique et (bio)compatible. La dégradabilité du PMLA résulte de la présence de liaisons esters dans la chaîne principale.

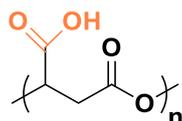


Figure 65 : Structure du PMLA avec la fonction acide carboxylique latérale en orange

De plus, ce polymère est facilement modifiable grâce à la présence de fonctions acides carboxyliques latérales²⁹.

Grâce à la maîtrise de la synthèse des monomères et de leur homo- et copolymérisation, toute une famille de dérivés du PMLA peut être obtenue, dérivés possédant des propriétés physico-chimiques et biologiques ajustées via la nature des unités de répétition et celle de l'amorceur³⁰⁻³³.

Parmi les dérivés du PMLA, nous pouvons citer les travaux réalisés sur :

- La forme polymère-principe actif décrite par Venkatraj *et al.*³⁴. Sur les fonctions acides carboxyliques latérales du PMLA, ces auteurs ont greffé de la doxorubicine comme principe actif et de la *N*-acétyl-D-galactosamine comme agent de ciblage. Le récepteur visé est une glycoprotéine membranaire, très présente, à la surface de l'hépatocarcinome humain (cancer primitif) : l'asialoglycoprotéine. Les résultats obtenus attestent de l'intérêt de l'agent de ciblage qui permet de diminuer quasiment par deux la dose de doxorubicine à administrer pour atteindre la concentration inhibitrice de 50 % des cellules (IC₅₀).
- La forme nanoparticulaire décrite par Huang *et al.*^{33,35-37}. Ils ont synthétisé et formulé différents dérivés du PMLA, le dérivé benzylé (PMLABe), le copolymère poly(éthylène glycol) (PEG)-*bloc*-PMLABe et le copolymère biotine-PEG-*bloc*-PMLABe. Les résultats obtenus sont très encourageants car les nanoparticules étudiées

présentaient une très faible toxicité *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'une bonne captation par les différents types de cellules testées (HuH7, Caco, MDA)

Comme nous l'avons dit précédemment, les nanoparticules préparées à partir de (co)polymères obtenus par polymérisation en présence d'amorceurs chimiques peuvent être à l'origine de toxicité liées à la présence de traces de ces amorceurs qui sont, souvent, des molécules très toxiques. Par conséquent, nous avons souhaité comparer les toxicités aiguës et chroniques de nanoparticules préparées à partir de PMLABe synthétisés, soit par polymérisation chimique (PMLABe chimiques), soit par polymérisation enzymatique (PMLABe enzymatiques) décrites dans les chapitres précédents. Le but de cette étude est d'évaluer les effets de nanoparticules à base de PMLABe chimiques et enzymatiques sur le fonctionnement global des cellules, plutôt qu'uniquement sur la mort cellulaire.

I. Présentation de l'étude comparative de la toxicité des nanoparticules à base de PMLABe chimiques et enzymatiques

L'étude de toxicité a porté sur un ensemble de sept lots de nanoparticules préparées à partir de polymères synthétisés soit par voie chimique soit par voie enzymatique à partir de MLABe racémique ou optiquement actif. Les nanoparticules sont obtenues par la technique de nanoprécipitation mise au point par Thioune *et al.*^{38,39}, technique très simple qui consiste en l'addition rapide d'une solution de (co)polymères dans un solvant organique dans une phase aqueuse sous forte agitation, le solvant des (co)polymères devant être miscible à l'eau. Les nanoparticules se forment alors instantanément grâce à la nature hydrophobe ou amphiphile des (co)polymères. Après élimination du solvant organique sous pression réduite, une solution aqueuse de nanoparticules est obtenue et caractérisée. La captation, les toxicités chronique et aiguë de ces solutions de nanoparticules ont été ensuite étudiées sur des cellules hépatiques HepaRG.

1. Les polymères utilisés durant l'étude

Sept polymères différents ont été testés. Deux polymères ont été synthétisés par voie chimique, un à partir du *RS*-MLABe et l'autre à partir du *R*-MLABe. Les cinq autres ont été synthétisés par voie enzymatique. Parmi ces cinq polymères enzymatiques, deux ont été synthétisés à partir du *RS*-MLABe, et deux autres à partir de MLABe optiquement actif (*R*-MLABe et *S*-MLABe). Le dernier est un copolymère à bloc amphiphile avec un bloc

hydrophile de poly(éthylène glycol), PEG (\overline{M}_w 736 g/mol), et un bloc hydrophobe de PMLABe.

Les polymères synthétisés par voie chimique ont été obtenus par polymérisation anionique par ouverture de cycle du MLABe, racémique ou optiquement actif (1 eq.), en présence de benzoate de tétraéthylammonium comme amorceur ($7 \cdot 10^{-3}$ eq.), sous atmosphère inerte à 40°C. Une fois la réaction terminée (disparition de la fonction carbonyle du cycle lactonique à $1\ 850\ \text{cm}^{-1}$ suivie par infra-rouge), le polymère est dissous dans du chloroforme puis précipité dans de l'éther diéthylique froid.

Les PMLABe préparés par voie enzymatique ont été synthétisés en utilisant les conditions optimisées déterminées grâce à l'extrapolation du plan d'expérience. La lipase de pancréas de porc (PPL) solubilisée dans du tampon Tris/HCl (105 mM, pH 7) est mise en réaction avec le MLABe, racémique ou optiquement actif (ratio PPL/MLABe 1/40). La réaction se déroule à 60°C, sous agitation pendant 72 h. Après les traitements habituels, les polymères sont précipités dans de l'éther diéthylique froid.

Le copolymère poly(éthylène glycol)-*bloc*-poly(malate de benzyle), PEG-*b*-PMLABe, a été synthétisé par voie enzymatique en utilisant un α -méthoxy- ω -hydroxyl poly(éthylène glycol) (MeOPEGOH) comme macro-amorceur (\overline{M}_w 736 g/mol). La PPL (rapport massique PPL/MLABe 1/40), le MLABe racémique (1 eq.) et le MeOPEGOH (0,05 eq.) sont mis en contact dans du toluène anhydre sous atmosphère inerte. Après 72 h à 60°C, la réaction est stoppée et le polymère est purifié par les traitements habituels.

Le Tableau 28 récapitule les voies de synthèse des polymères utilisés durant l'étude biologique ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques.

L'ensemble des mesures a été effectué après précipitation des polymères dans de l'éther diéthylique.

Les masses molaires moyennes en masse et la dispersité ont été mesurées par SEC dans le THF (standards poly(styrène)). Les températures de fusion ont été mesurées par DSC et les pouvoirs rotatoires par polarimétrie dans du chloroforme ($c \approx 1$).

Tableau 28 : Caractéristiques physico-chimiques des polymères testés.

N°	Monomère	Synthèse	\overline{M}_w (g/mol)	Đ	T _f (°C)	$[\alpha]_D^{25^\circ C}$
1	RS-MLABe	chimique	14 850	1,6	---	0
2	R-MLABe	chimique	30 000	N.D.*	151	-10,7
3	RS-MLABe	enzymatique	12 250	1,4	77	0
4	RS-MLABe	enzymatique	3 850	1,5	105	-3
5	R-MLABe	enzymatique	2 000	1,5	140	-11
6	S-MLABe	enzymatique	2 300	1,4	124	18
7	RS-MLABe / MeOPEGOH	enzymatique	9 650	1,5	N.D.*	N.D.*

*N.D. non déterminé

Les polymères ont ensuite été formulés, dans différentes conditions, en fonction des tests biologiques menés. Trois formulations de nanoparticules ont été réalisées :

- un premier lot de nanoparticules a été préparé pour évaluer la toxicité chronique,
- un deuxième lot de nanoparticules a été préparé pour évaluer la toxicité aiguë,
- et un dernier lot de nanoparticules a été préparé pour réaliser les tests de captation qui permettent de s'assurer de l'internalisation des nanoparticules dans les cellules.

La méthodologie générale de la formulation reste la même : le polymère est dissous dans un solvant organique miscible à la phase aqueuse, cette solution est additionnée rapidement dans un milieu aqueux sous forte agitation puis le solvant organique est évaporé sous pression réduite.

La diffusion dynamique de lumière (DLS), permet de mesurer le diamètre hydrodynamique (D_h) et la distribution en taille (PDI) des nanoparticules. Les résultats de ces analyses DLS seront présentés dans un tableau pour chaque formulation avant les résultats du test biologique correspondant.

2. Les types de tests biologiques réalisés

Tests de captation

Avant de tester la toxicité des nanoparticules de PMLABe, nous nous sommes assurés que celles-ci étaient bien internalisées par les cellules HepaRG, et dans quelle proportion, grâce à un test de captation. Les polymères sont formulés de manière à encapsuler une sonde fluorescente, le DiR, (DiI_{C18}(7) (1,1''-dioctadécyl-3,3, 3'',3''-tétraméthylindotricarbocyanine iodure) puis sont mis en contact avec les cellules HepaRG progénitrices pendant 24 h. Le DiR

est une sonde de type carbocyanine hydrophobe émettant dans le proche infrarouge (780 nm) (Figure 66).

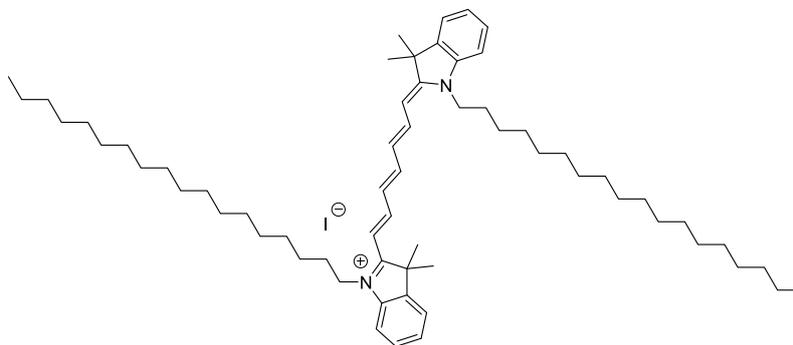


Figure 66 : Structure de la sonde fluorescente DiR

La fluorescence est ensuite mesurée par cytométrie en flux. Cette technique permet de déterminer si les nanoparticules fluorescentes ont été captées par les cellules et dans quelle proportion.

Tests de toxicité aigüe

Les cellules sont incubées avec des doses croissantes de nanoparticules. Le taux de survie est mesuré sur une période courte (1 à 3 jours). L'objectif est de déterminer la concentration inhibitrice pour laquelle seulement 50 % des cellules survivent : l'IC₅₀.

Les taux de survie sont calculés à partir de résultats de test d'une activité enzymatique mitochondriale effectués avec un sel de tétrazolium : le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). Le cycle de tétrazolium est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale en formazan par les cellules vivantes et métaboliquement actives⁴⁰.

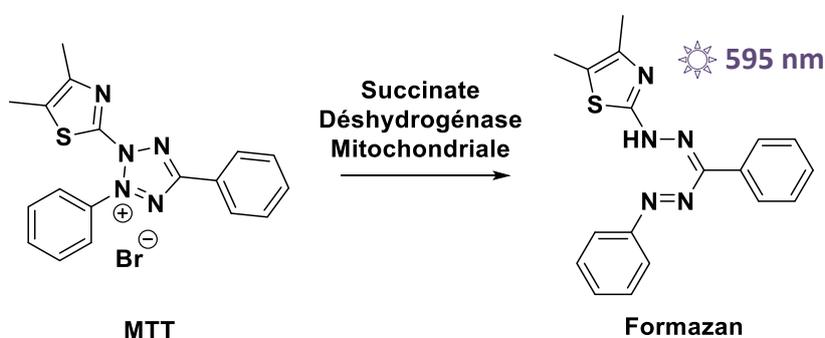


Schéma 4 : Schéma réactionnel du test MTT⁴⁰

Après dissolution du formazan par le DMSO, la densité optique (DO) de la solution est mesurée à 595 nm. La valeur de cette DO est le reflet de l'activité des cellules et dépend directement de la survie de celles-ci. Un taux de survie est ensuite calculé par rapport à un contrôle (cellules n'ayant subi aucun traitement) et permet d'estimer la toxicité des traitements réalisés dans les conditions de traitement.

Tests de toxicité chronique

La toxicité chronique s'intéresse à l'effet de l'accumulation des nanoparticules dans les cellules sur une longue période (3 à 4 semaines). Les cellules vont être exposées à plusieurs reprises à une faible concentration de nanoparticules. L'objectif est de s'intéresser à la toxicité de façon plus fine que la mort cellulaire et d'observer les effets des nanoparticules de PMLABe sur le fonctionnement cellulaire global.

Le taux de survie cellulaire est toutefois mesuré après chaque exposition par un test MTT pour s'assurer que les doses administrées ne sont pas cytotoxiques. Le suivi de la DO au fil des semaines permet également d'observer l'évolution de la population cellulaire et son activité.

Les modifications et les variations du métabolisme cellulaire, liées par exemple à la l'induction ou à la répression de l'expression d'un gène, sont détectables et quantifiables grâce à l'étude des ARN messagers (ARNm) extraits des cellules. Il est possible, ensuite, de connaître le niveau d'expression des gènes à partir de ces ARNm extraits, grâce aux techniques d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), telles que la PCR par transcription inverse (RT-PCR) et la PCR quantitative (qPCR) ⁴¹.

Les objectifs et la méthodologie de ces études sont donc complètement différents, mais complémentaires. La Figure 67 rappelle les objectifs et les lignes directrices de ces tests.

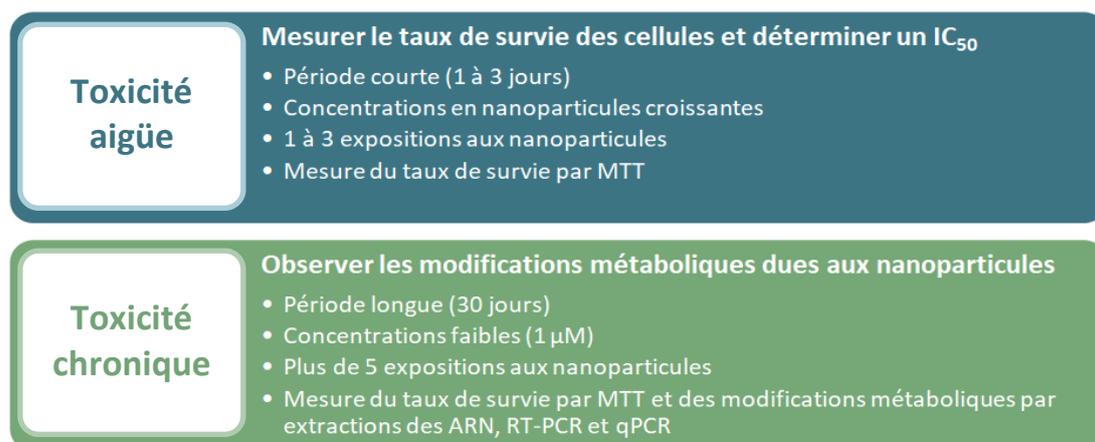


Figure 67 : Résumé des tests biologiques réalisés

3. HepaRG un excellent modèle *in vitro* pour tester la toxicité hépatique

Le foie est l'organe principal du métabolisme des toxiques qu'ils soient endogènes ou étrangers au corps (xénobiotiques). Il est chargé de l'élimination de tous les xénobiotiques, comme les médicaments ou les polluants de l'environnement ⁴². Le xénobiotique va subir deux phases de dégradation dans le foie entre son absorption et son excrétion. La phase I consiste en la fonctionnalisation des molécules étrangères et regroupe les réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. La majorité de ces réactions est catalysée par des enzymes de la famille des cytochromes P450 qui jouent un rôle primordial dans le métabolisme du foie. Ensuite, lors de la phase II, la molécule fonctionnalisée va être couplée avec une molécule hydrophile telle que l'acide glucuronique, le glutathion ou la glycine. Le résultat de ces deux phases est, d'une part, la perte significative d'activité du xénobiotique et, d'autre part, une augmentation du caractère hydrophile de la molécule facilitant ainsi son élimination hépatique ou rénale.

L'étude de la toxicité hépatique est donc d'une importance capitale pour tout objet ayant une visée biomédicale comme nos nanoparticules de PMLABe. Cependant, les modèles *in vivo* sur les animaux sont peu transposables à l'être humain à cause de grandes différences entre les espèces dans les métabolismes de dégradations des xénobiotiques ⁴³ et peuvent engendrer des problèmes éthiques. C'est pourquoi, des modèles *in vitro* de cellules hépatiques humaines ont été développés soit à partir d'hépatocytes humains primaires

(obtenus à partir d'un foie entier ou d'un fragment de foie) soit de lignées immortalisées (issues d'une tumeur cancéreuse).

Les hépatocytes primaires humains sont le modèle le plus proche du foie *in vivo*, mais leur obtention est difficile et très variable, et leur temps de vie très court. La culture des lignées immortelles est connue et maîtrisée, mais elle présente des dysfonctionnements au niveau métabolique, notamment pour les enzymes de la famille des cytochromes P450 responsable de l'élimination des xénobiotiques ⁴⁴.

Par conséquent, la lignée cellulaire HepaRG, isolée dans les années 2000 à partir d'une tumeur de foie d'une patiente souffrant d'un hépatocarcinome (tumeur primitive maligne du foie), présente un système métabolique exceptionnellement proche du foie *in vivo* ⁴³. En effet, les cellules HepaRG présentent un cycle cellulaire particulier qui fait son intérêt. Lors de l'ensemencement, les cellules présentent un phénotype indifférencié de cellules allongées (Figure 68).

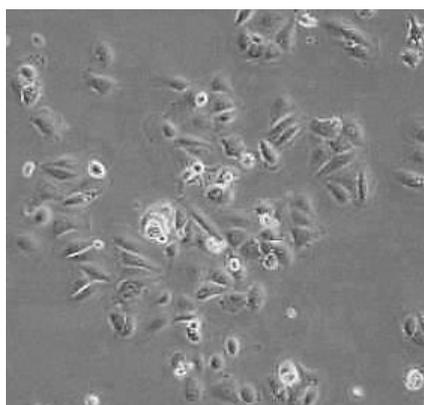
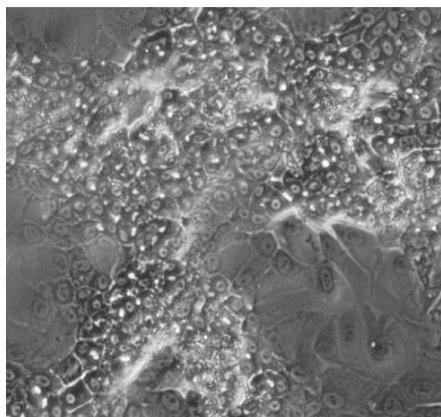


Figure 68 : Cliché de cellules HepaRG progénitrices

Ces cellules bipotentes, appelées progéniteurs hépatiques, ont une vitesse de croissance très rapide et vont, à confluence, engager un programme de différenciation qui donnera deux types cellulaires différents (Figure 69) :

- les hépatocytes, cellules de petites tailles qui se regroupent en amas et forment des canalicules biliaires (polarisation de la membrane plasmique constituant des pôles biliaires) par lesquels sont excrétés les xénobiotiques. Elles assurent une grande part des réactions d'élimination des molécules étrangères en exprimant les cytochromes P450 et les enzymes de la phase II.

- les cholangiocytes, cellules de grandes tailles avec un cytoplasme très clair et un noyau moins visible en microscopie.



- _____ hépatocyte
- _____ cholangiocyte
- _____ canalicule biliaire

Figure 69 : Cliché de cellules HepaRG différenciées

L'ajout de DMSO dans le milieu de culture permet d'accélérer la différenciation et d'obtenir des cellules pleinement différenciées.

Cette richesse phénotypique permet de mimer *in vitro*, de façon très proche, le métabolisme du foie *in vivo*. De plus, les cellules HepaRG peuvent se rétrodifférencier, c'est-à-dire qu'elles peuvent retrouver un phénotype indifférencié lorsqu'elles sontensemencées à faible densité. Ce cycle cellulaire si particulier est schématisé par la Figure 70.

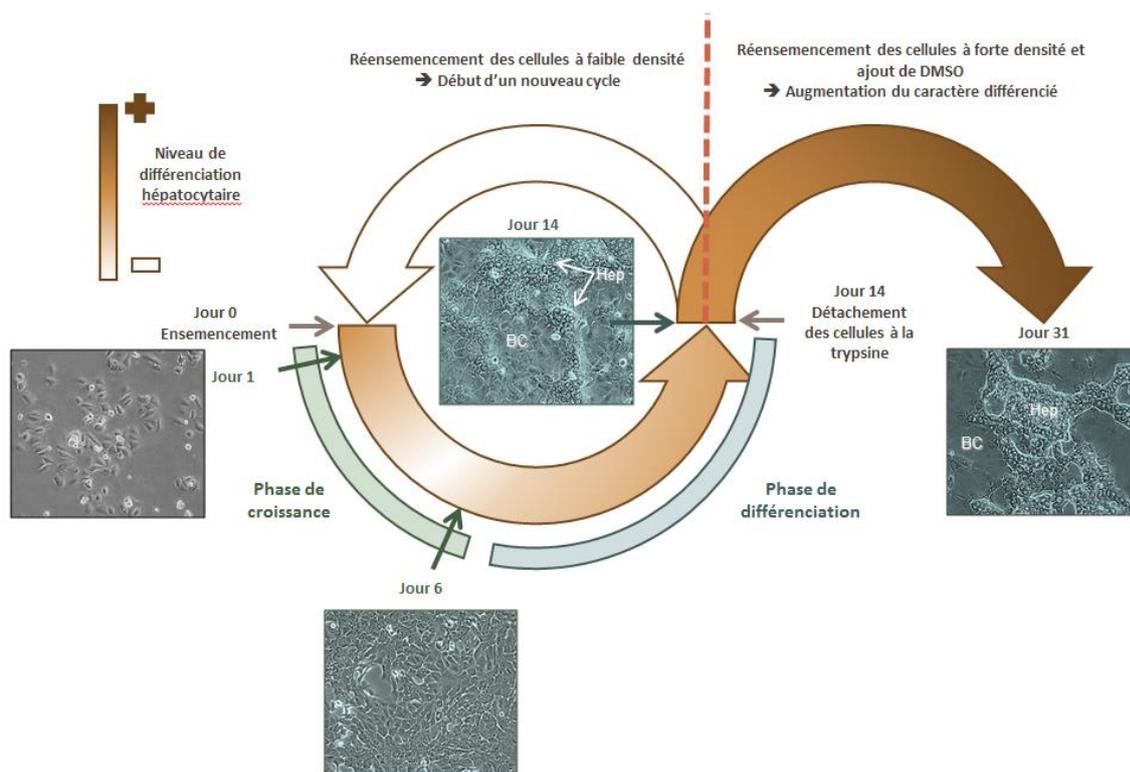


Figure 70 : Cycle cellulaire des cellules HepaRG

Le modèle HepaRG permet donc de tester la toxicité à la fois sur des cellules indifférenciées et différenciées, et aussi d'étudier le comportement des cellules sur plusieurs semaines à partir de cellules indifférenciées proliférantes jusqu'aux cellules différenciées quiescentes. Ce modèle est donc idéal pour les tests de toxicité chronique.

II. Résultats du test de captation des nanoparticules par les cellules HepaRG

1. Méthodologie de l'étude

Les cellules HepaRG progénitrices vont être exposées, le lendemain de leur ensemencement, à des solutions à 1 μM de nanoparticules contenant, dans leur cœur hydrophobe, une sonde fluorescente, le DiR. Après 24 h d'exposition, les cellules sont rincées, décollées et triées en fonction de l'intensité de leur fluorescence par cytométrie en flux.

2. Formulation des nanoparticules

Les PMLABe sont solubilisés dans du DMF (5 mg dans 100 μL), puis 50 μL d'une solution de DiR, à une concentration de 1 mg/mL dans du DMF, sont ajoutés (1 % en masse par rapport à la quantité de polymère). Ensuite, ce mélange est additionné rapidement dans de l'eau

distillée sous forte agitation. Après agitation pendant 1 h, les nanoparticules contenant le DiR sont passées sur une colonne d'exclusion stérique Séphadex permettant de séparer le DiR libre du DiR encapsulé dans les nanoparticules. Pour mesurer la quantité de DiR encapsulé dans les nanoparticules, 80 µL de la solution de nanoparticules encapsulant le DiR sont additionnées à 320 µL de DMF. La densité optique de ces solutions est ensuite mesurée à 670 nm. La quantité de DiR encapsulée est déterminée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de solutions de DiR à différentes concentrations dans un mélange DMF/eau (80/20), comme le montre la Figure 8.

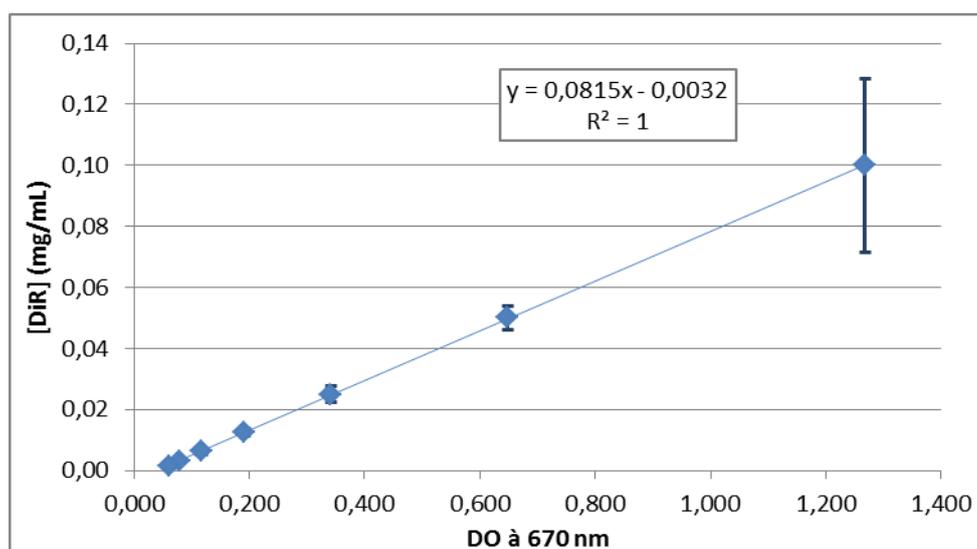


Figure 71 : Courbe d'étalonnage donnant la concentration en DiR dans un mélange DMF/eau (80/20) en fonction de la DO. Connaissant la quantité initiale de DiR, nous pouvons donc déterminer le taux d'encapsulation.

Le Tableau 29 regroupe les diamètres hydrodynamiques et les PDI, mesurés par DLS, des nanoparticules de PMLABe utilisées pour l'étude de captation, ainsi que les taux d'encapsulation de la sonde DiR calculés à partir des résultats de spectrophotométrie.

Tableau 29 : Caractéristiques des nanoparticules encapsulant le DiR utilisées lors de l'étude de captation

Entrée	Monomère	Synthèse	D _h (nm)	PDI	Taux d'encapsulation
NP1	RS-MLABe	chimique	195	0,19	61 %
NP2	R-MLABe	chimique	170	0,26	quantitatif
NP3	RS-MLABe	enzymatique	200	0,13	45 %
NP4	RS-MLABe	enzymatique	125	0,19	83 %
NP5	R-MLABe	enzymatique	145	0,19	95 %
NP6	S-MLABe	enzymatique	130	0,16	94 %
NP7	RS-MLABe / MeOPEGOH	enzymatique	185	0,24	quantitatif

Les nanoparticules obtenues ont toutes des diamètres hydrodynamiques compris entre 125 et 200 nm, valeurs attendues pour des nanoparticules hydrophobes encapsulant une sonde fluorescente telle que le DiR. Les échantillons peuvent être considérés comme relativement monodisperses car les PDI, indicateurs de la distribution des tailles des nanoobjets et donc de la dispersité des échantillons, sont tous compris entre 0,13 et 0,26.

Les résultats rassemblés dans le Tableau 29 montrent que les taux d'encapsulation varient entre 45 % et 95 %, avec des taux d'encapsulation quantitatifs pour les NP2 et les NP7. Ces données sont confirmées par les aspects des solutions de nanoparticules (Photo 1). En effet, ces photos mettent en évidence des colorations bleues plus opaques pour les NP2 et les NP7 (photos encadrées en bleu) et plus faibles pour les NP3 (photo encadrée en rouge).



Photo 1 : Aspect des nanoparticules encapsulant le DiR

3. Analyse des tests de captation et résultats

Après les 24 h d'exposition, les cellules progénitrices sont triées en fonction de l'intensité de leur fluorescence par cytométrie en flux.

Dans un premier temps, il faut déterminer la fenêtre pour laquelle le cytomètre va effectuer la mesure de la fluorescence en fonction de la taille et de la granulométrie (Figure 72). En effet, l'échantillon, contenant les cellules viables et isolées qui nous intéressent, présente également des débris cellulaires et des amas de cellules. La sélection de la fenêtre appropriée permet d'éliminer ce type d'interférence. De plus, si des nanoparticules non internalisées étaient encore présentes leur petite taille les exclurait de la mesure.

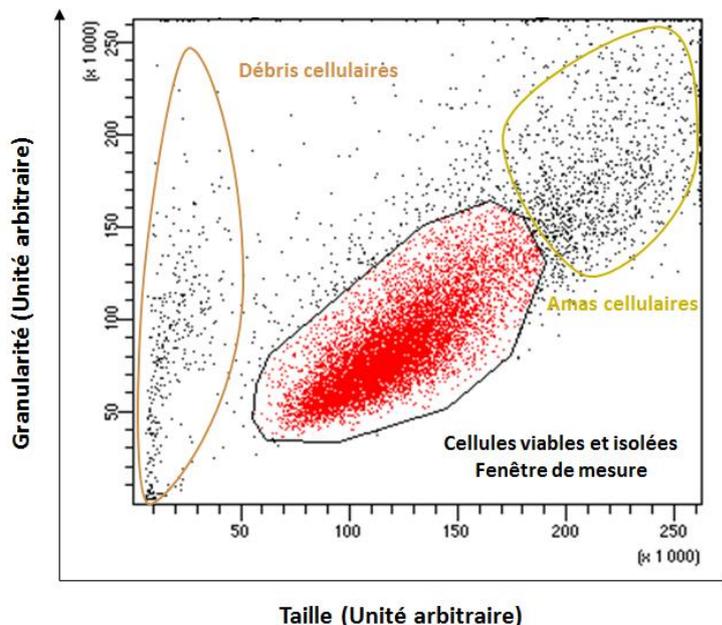


Figure 72 : Détermination de la fenêtre de mesure de la fluorescence du cytomètre en fonction de la taille et de la granulométrie

L'étape suivante consiste à mesurer l'auto-fluorescence des cellules n'ayant pas subi de traitement (Figure 73). Cette mesure permet ensuite de faire la différence entre les cellules négatives, qui n'auront pas captées de nanoparticules, et les cellules positives, qui, elles, en auront captées. La zone de cellules négatives (à gauche, Figure 73) reste la même pour la suite des mesures.

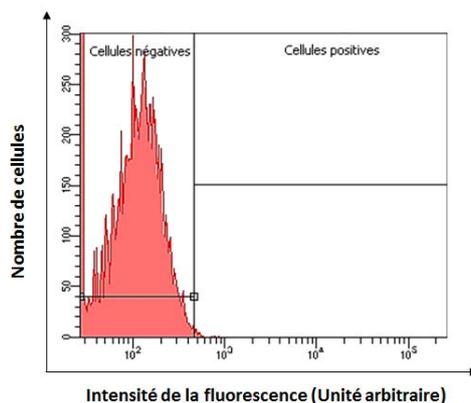


Figure 73 : Histogramme de la mesure de fluorescence pour les cellules contrôles

Enfin, les cellules traitées avec les nanoparticules sont analysées. La Figure 74 regroupe l'ensemble des histogrammes obtenus.

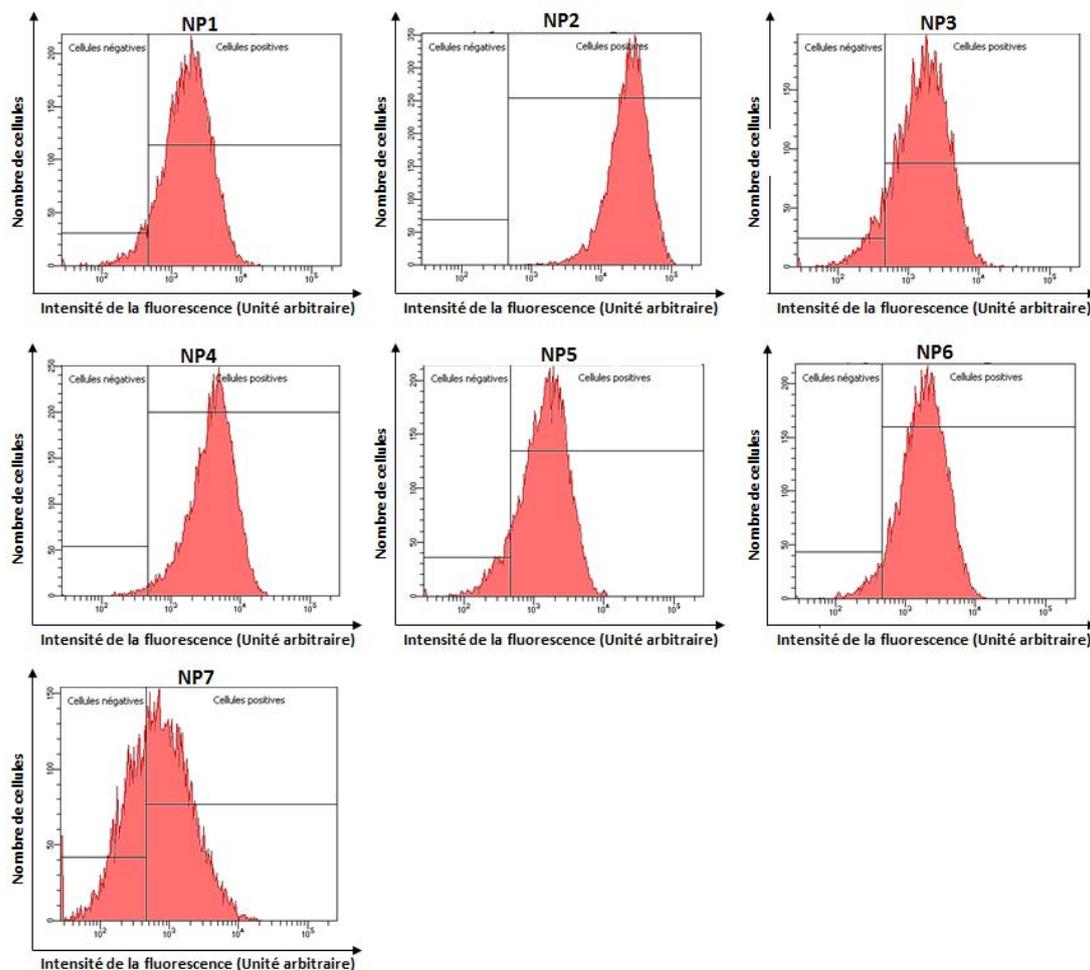


Figure 74 : Histogrammes des mesures de fluorescence des cellules traitées par les différentes formulations.

De façon générale, les nanoparticules sont bien captées par les cellules progénitrices HepaRG puisque la majorité des cellules se situe dans la partie droite des histogrammes, celle des cellules positives. La seule exception est pour la formulation NP7, où une partie des cellules se situe dans la partie droite de l'histogramme, celle des cellules négatives. Ce résultat est logique puisque les nanoparticules NP7 sont constituées de copolymères amphiphiles contenant un bloc PEG. Or, ce polymère est connu pour son effet de furtivité, limitant donc la captation des nanoobjets contenant le PEG ².

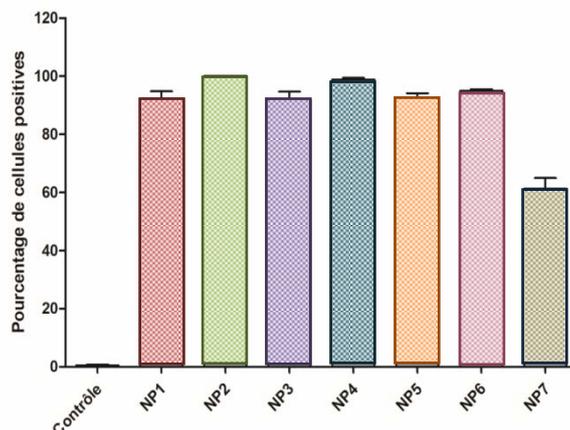


Figure 75 : Pourcentage de cellules positives en fonction du type de nanoparticules.

La Figure 75, représentant le pourcentage de cellules positives pour chaque formulation, confirme ces observations. En effet, les nanoparticules NP1 à NP6 sont très bien captées par les cellules HepaRG, avec un pourcentage de cellules positives compris entre 90 et 100 %. La formulation NP7, quant à elle, est captée à hauteur de 60 %.

La deuxième information à extraire des histogrammes (Figure 74) est l'intensité de la fluorescence des cellules ayant captées les nanoparticules.

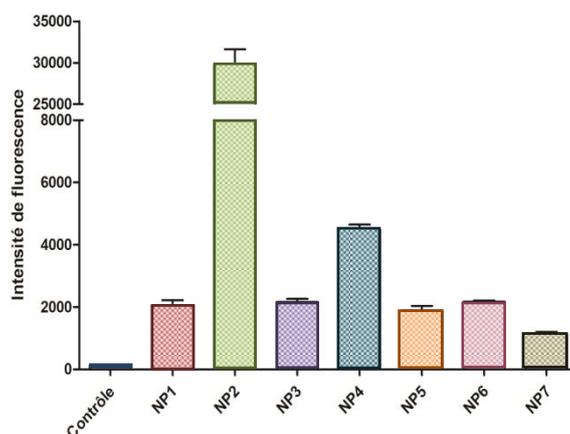


Figure 76 : Intensité de la fluorescence mesurée sur les cellules en fonction du type de nanoparticules.

La Figure 76 représente l'intensité de fluorescence moyenne mesurée sur les cellules en fonction du traitement subi. Plus cette intensité de fluorescence moyenne est élevée, plus le nombre de nanoparticules fluorescentes internalisées est important. Deux formulations sortent du lot : les formulations NP2 et NP4. Ces deux formulations sont beaucoup mieux captées par les cellules HepaRG, avec un facteur 15 pour les NP2 et un facteur de 2,5 pour

les NP4 par rapport aux autres nanoparticules. Cependant, les concentrations massiques étant différentes pour chacune des formulations (Tableau 30), il est possible qu'une partie de cet écart soit dû à une plus grande quantité massique de polymère, surtout pour les NP2.

Tableau 30: Concentrations massiques des différentes formulations lors du test de captation

Entrée	Concentrations massiques ($\mu\text{g/mL}$)
NP1	15
NP2	30
NP3	12
NP4	4
NP5	2
NP6	2
NP7	10

Malgré tout, ces concentrations massiques n'expliquent pas les résultats obtenus pour les NP4. En effet, bien que sa concentration massique soit plus faible que celle des NP1, elles sont mieux captées par les cellules HepaRG. Les différences de captation peuvent donc être dues aux propriétés physico-chimiques des polymères formant les nanoparticules, notamment leurs masses molaires. En effet, la seule différence entre les formulations NP3 et NP4, préparées à partir des polymères synthétisés par voie enzymatique, est la masse molaire des polymères. Il est également possible que les nanoparticules aient des morphologies différentes entre elles (sphère ou plus ou moins ovoïde), morphologies qui influencent la captation. Une observation par microscopie électronique en transmission (TEM) permettrait de comparer les morphologies des nanoparticules préparées.

La chiralité du monomère doit également jouer un rôle important. En effet, les masses molaires des polymères utilisés pour les formulations NP4, NP5 et NP6 sont proches ; la seule différence provient de la configuration du monomère.

En revanche, la méthode de synthèse des polymères, chimique versus enzymatique, semble avoir peu d'effet puisque les NP1 (PMLABe chimique) et NP3 (PMLABe enzymatique) sont captées de façon similaire par les cellules HepaRG. Il serait intéressant de tester la captation de nanoparticules provenant de polymères chimiques ayant une masse molaire proche de celle des polymères constituant les NP4 afin de déterminer si la voie de synthèse, chimique versus enzymatique, a un effet, ou pas, sur la captation quelle que soit la taille.

Par ailleurs, des tests complémentaires sont en cours de réalisation avec les mêmes nanoparticules, mais cette fois ci, les solutions de nanoparticules sont préparées à des concentrations massiques égales afin d'éliminer le doute concernant l'influence des concentrations massiques sur les taux de captation.

4. Conclusions

Nous avons montré que les nanoparticules sont captées par 90 à 100 % des cellules HepaRG progénitrices, sauf pour la formulation à base de copolymère PEG-*b*-PMLABe pour laquelle le taux de cellules positives diminue de 40 %. Cette différence était attendue en raison du caractère furtif du PEG qui limite la captation des formulations en contenant.

Toutefois, deux formulations sont sensiblement mieux captées que les autres : celle constituée de PMLABe chimiques synthétisés à partir du monomère *R* du MLABe (NP2) et celle constituée de PMLABe enzymatiques synthétisés à partir du MLABe racémique (NP4).

La masse molaire du polymère et la chiralité du monomère semblent être deux paramètres ayant une influence non négligeable sur la captation des nanoparticules. Par contre, la voie de synthèse, chimique versus enzymatique, semble avoir peu d'effet sur cette captation.

Des tests complémentaires sont en cours pour s'assurer que ces différences de captation ne soient pas liées à des concentrations massiques différentes.

III. Résultats de l'étude de toxicité aiguë des nanoparticules sur les cellules HepaRG

1. Méthodologie de l'étude

Les cellules HepaRG progénitrices ont été exposées à des concentrations croissantes de nanoparticules allant de 0,5 μM à 20 μM . La toxicité des nanoparticules sur les cellules HepaRG est mesurée après une seule exposition de 24 heures, puis elle est à nouveau mesurée au bout de 72 heures après 3 expositions successives de 24 h chacune.

2. Formulation des nanoparticules

Les PMLABe ont été dissous dans du 1,4-dioxane, puis cette solution est additionnée rapidement dans du tampon phosphate salin (PBS) à pH 7,2. Après 10 min d'agitation, le 1,4-dioxane est évaporé sous pression réduite. La concentration finale en polymère est de 200 μM . Pour cette formulation, l'eau a été remplacée par du tampon afin d'éviter des

problèmes de dilution et d'osmolarité lors des tests *in vitro*. De plus, contrairement au protocole habituel, la concentration finale est exprimée en « micromole par litre », plutôt qu'en « microgramme par litre », afin d'ajouter le même volume de chaque solution dans chaque puits contenant les cellules.

Le Tableau 31 regroupe les diamètres hydrodynamiques et les PDI, mesurés par DLS, des nanoparticules à base de PMLABe utilisées pour l'étude de la toxicité aiguë.

Tableau 31 : Caractéristiques des nanoparticules utilisées lors de l'étude de toxicité aiguë

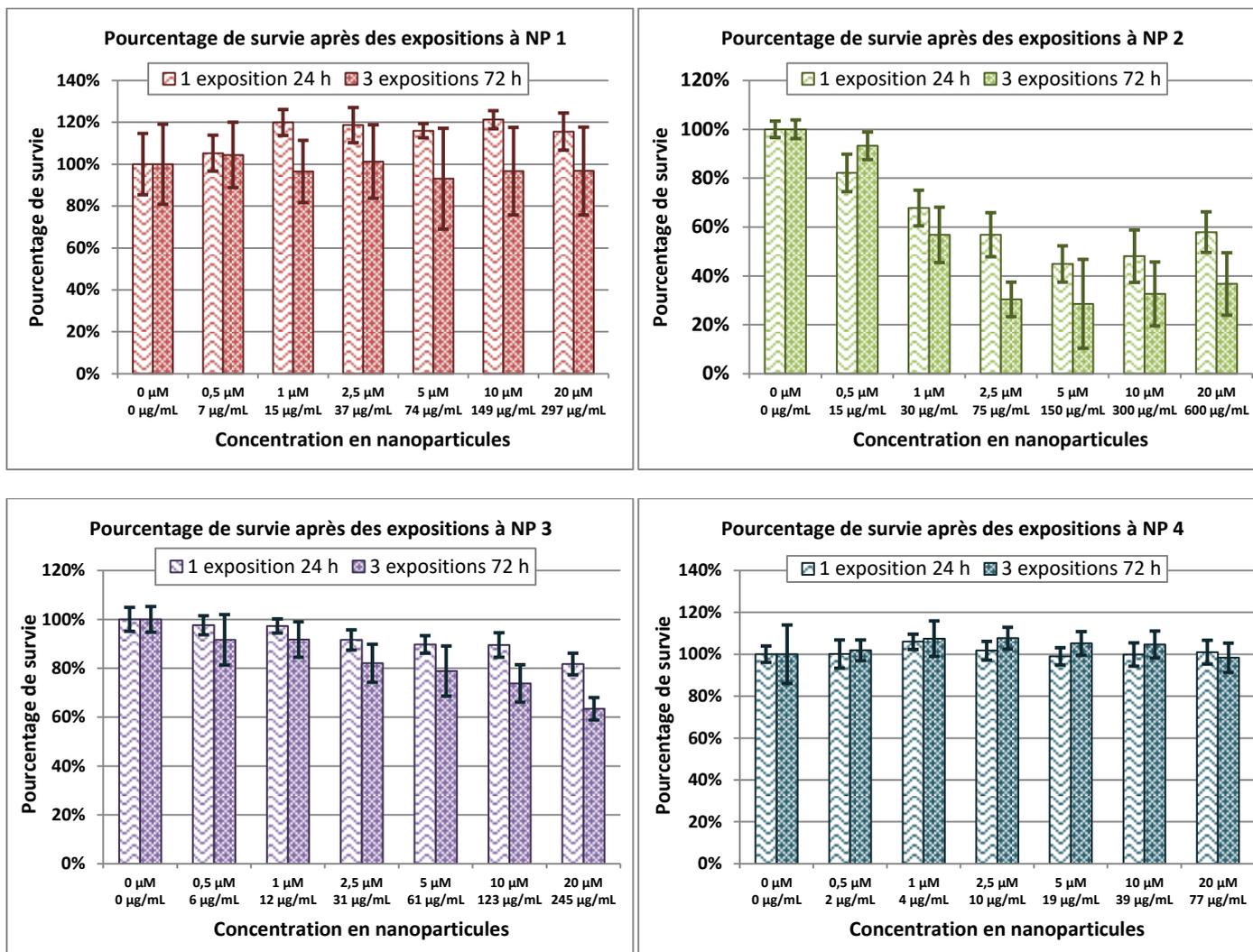
Entrée	Monomère	Synthèse	D _h (nm)	PDI
NP1	RS-MLABe	chimique	505	0,15
NP2	R-MLABe	chimique	2 900	0,28
NP3	RS-MLABe	enzymatique	690	0,16
NP4	RS-MLABe	enzymatique	995	0,09
NP5	R-MLABe	enzymatique	965	polydisperse
NP6	S-MLABe	enzymatique	211	0,16
NP7	RS-MLABe / MeOPEGOH	enzymatique	140	0,25

Les diamètres hydrodynamiques mesurés pour ces formulations sont anormalement élevés. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat :

- La volonté d'avoir une concentration molaire égale a entraîné de forte disparité de concentration massique lors de la formulation à cause des différences de masses molaires entre chaque polymère. Pour les NP2, la concentration massique finale en polymère est de 6 mg/mL, soit plus du double de la concentration utilisée pour ce genre de nanoparticules (2,5 mg/mL)³⁵. De plus, les travaux de Fessi *et al.*⁴⁵, ont montré que la taille des nanoparticules augmentait lorsque la concentration en polymère dans la phase organique augmentait (donc avant la précipitation), et une trop forte concentration peut provoquer la formation d'agrégats.
- L'auto-assemblage des polymères basé sur des interactions faibles a pu être déstabilisé par l'utilisation du tampon phosphate salin qui contient les ions Na⁺, Cl⁻, K⁺, HPO₄²⁻ et H₂PO₄⁻. Les polymères ont donc du mal à s'organiser et forment des micro-objets plutôt que des nano-objets. Par contre, la distribution des tailles des différentes formulations est correcte, sauf pour la formulation NP5 qui est très polydisperse.

Toutefois, ces formulations ont été utilisées pour évaluer leur toxicité aigüe. Les résultats sont présentés avec une double échelle pour la concentration (μM et $\mu\text{g/mL}$). D'autre part, il est important de garder à l'esprit que les objets formés ont des diamètres hydrodynamiques anormalement élevés lors de l'interprétation des résultats.

3. Résultats des tests MTT



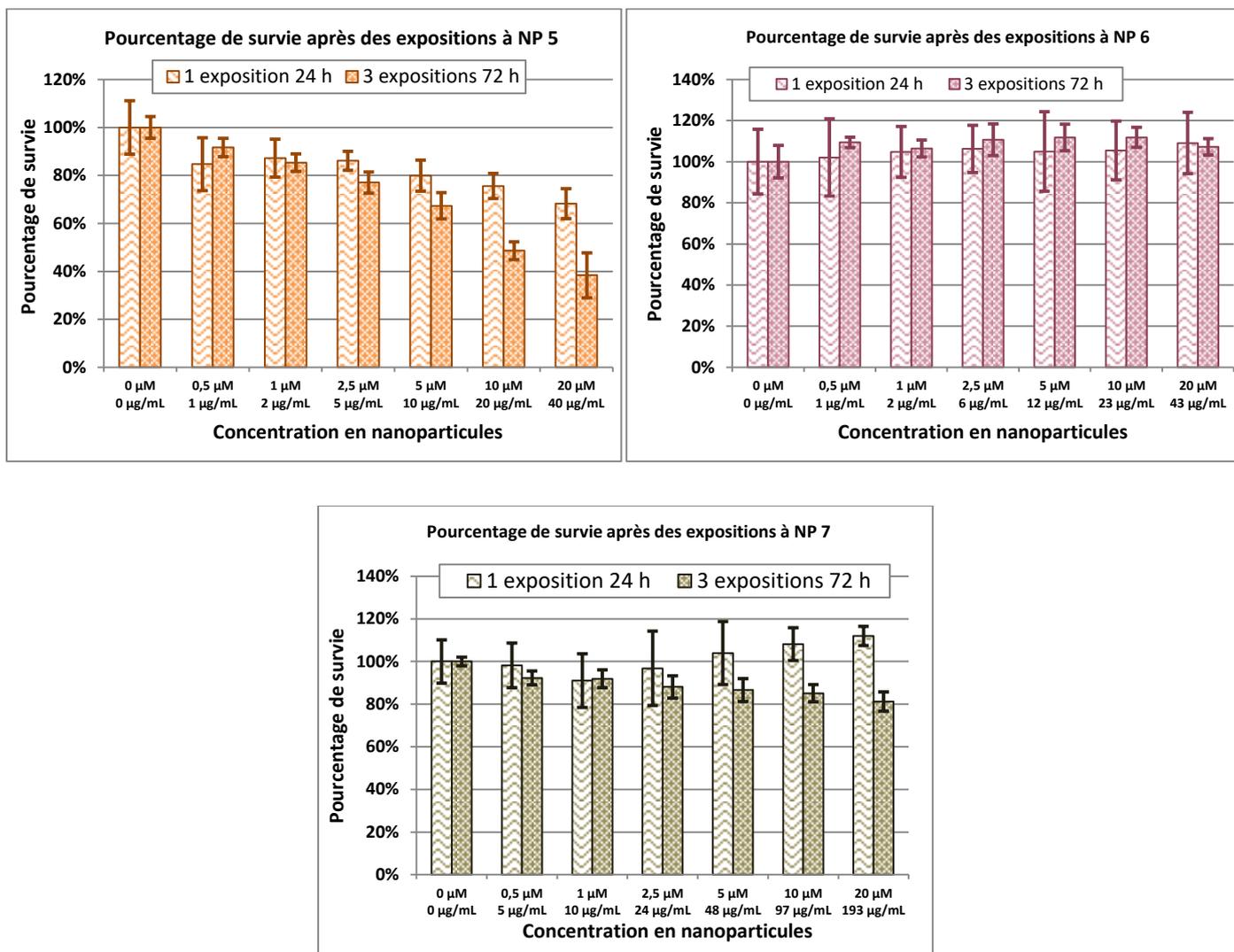


Figure 77 : Taux de survie des cellules en fonction des formulations et de leur concentration

Les résultats de la Figure 77 sont interprétés en se focalisant sur quatre aspects différents :

- L'effet de la masse molaire, en comparant les résultats obtenus pour les NP3 et les NP4,
- L'effet de la voie de synthèse, en comparant les résultats obtenus pour les NP1 et les NP3,
- L'effet de la chiralité du monomère, en comparant les résultats obtenus pour les NP4, les NP5 et les NP6,
- L'effet de la présence d'un bloc PEG, en comparant les résultats obtenus pour les NP3 et les NP7.

Effet de la masse molaire du polymère sur la toxicité des nanoparticules correspondantes sur les cellules HepaRG

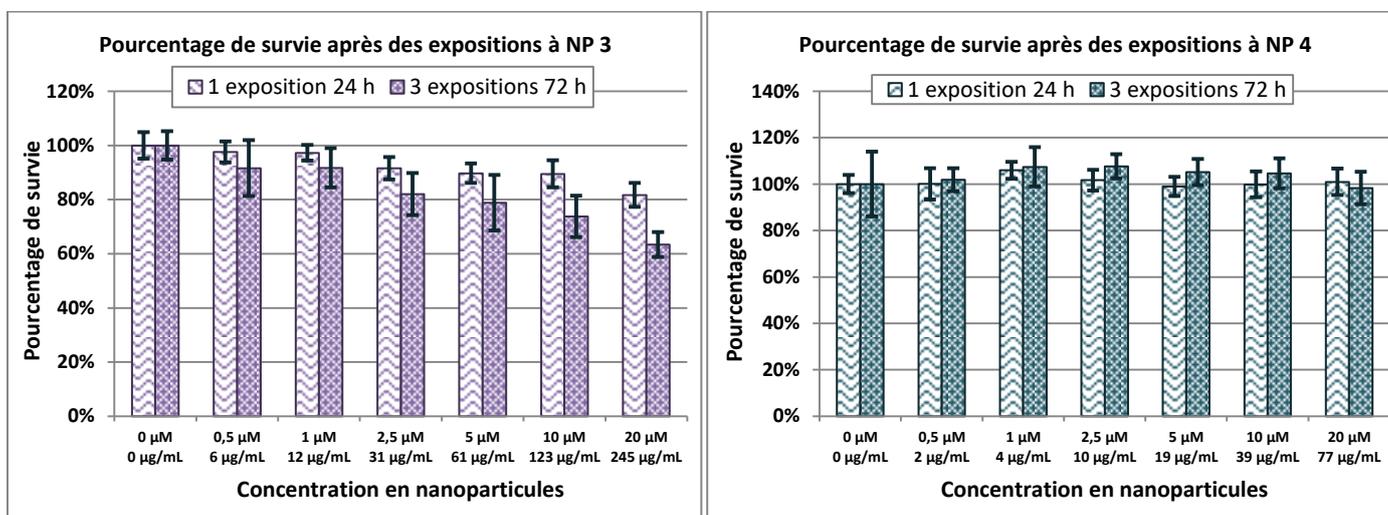


Figure 78 : Extrait de la Figure 77 illustrant l'effet de la masse molaire des polymères sur la toxicité des nanoparticules correspondantes

Les formulations NP3 et NP4 ont toutes les deux été préparées à partir de polymères synthétisés par voie enzymatique à partir du MLABe racémique. Par contre, le polymère constituant les NP3 a une masse molaire de 12 250 g/mol, contre 3 850 g/mol pour le polymère composant les NP4. Une toxicité est observée pour les NP3, contrairement aux NP4. En effet, à la concentration la plus forte (20 μ M), le taux de survie des cellules HepaRG ayant été traitées avec les NP3 est de 82 % après 1 exposition (63 % après 3 expositions), alors que le taux de survie des cellules traitées avec les NP4 est de 100 %, même après 3 expositions. De plus, une toxicité est visible pour les NP3 à partir de 5 μ M, soit 61 μ g/mL, alors que pour les NP4 à une concentration massique équivalente de 77 μ g/mL, le taux de survie des cellules HepaRG est toujours de 100 %.

Il semblerait donc que les formulations formées à partir de polymères de masses molaires élevées soient plus toxiques que les mêmes formulations composées de polymères de masses molaires plus faibles, que nous raisonnions en concentration massique ou molaire.

Effet de la voie de synthèse du polymère sur la toxicité des nanoparticules correspondantes sur les cellules HepaRG

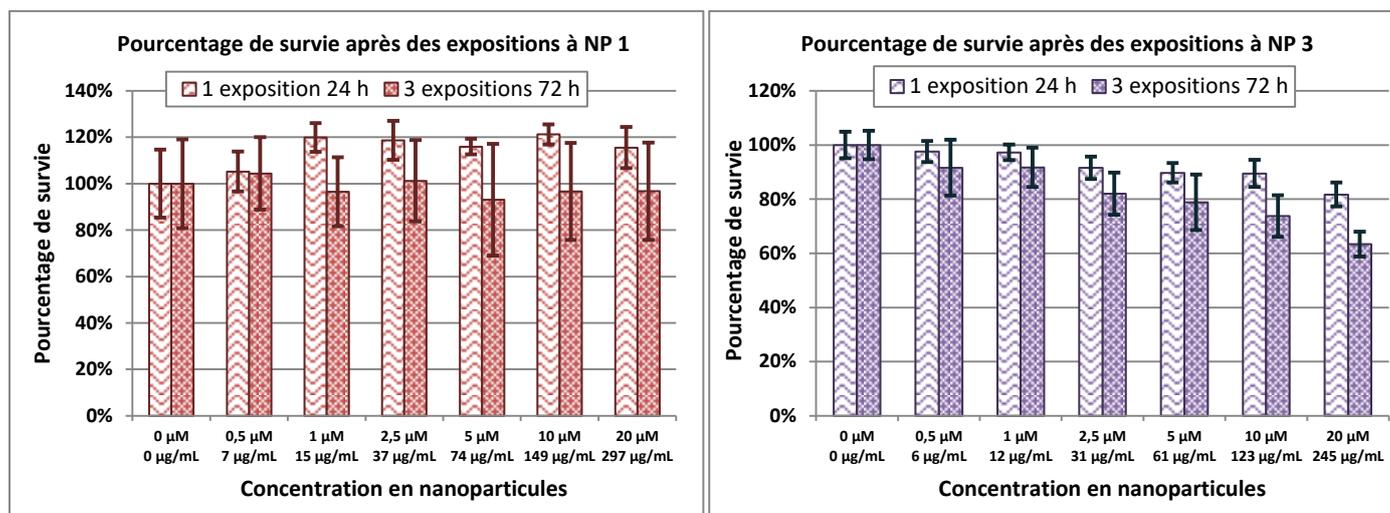


Figure 79 : Extrait de la Figure 77 illustrant l'effet de la voie de synthèse du polymère sur la toxicité des nanoparticules correspondantes

Les NP1 et les NP3 ont été formulées à partir de polymères ayant sensiblement les mêmes masses molaires, 14 850 g/mol et 12 250 g/mol, respectivement. La principale différence entre les deux polymères constituant ces deux formulations est donc leur voie de synthèse, puisque ils sont tous les deux synthétisés à partir du MLABe racémique. Le polymère constituant les NP1 a été synthétisé par voie chimique en utilisant le benzoate de tétraéthylammonium comme amorceur, alors que le polymère constituant les NP3 a été synthétisé par polymérisation enzymatique en présence de la lipase de pancréas de porc.

Contrairement à notre postulat de départ, les taux de survie des cellules exposées aux NP3 est plus faible que celles exposées aux NP1. En effet, le taux de survie des cellules traitées avec les NP3 est de 82 % lorsqu'elles sont exposées une fois à une dose de 20 µM (63 % après trois expositions), alors qu'il est de 116 % pour les NP1. Un effet protecteur est même observé pour les NP1 puisque, après une exposition et quelle que soit la dose administrée, le taux de survie est statistiquement supérieur à 100 %. Cet effet paradoxal a déjà été décrit pour des poly(triméthylène carbonate)-*bloc*-poly(acide malique) sur les cellules HepaRG ⁴⁶. L'hypothèse avancée est que le copolymère aurait une influence cytoprotective en piégeant les molécules toxiques et/ou en agissant directement sur la prolifération.

A masses molaire égales, les formulations issues des polymères enzymatiques paraissent plus toxiques que leurs homologues chimiques. Cette toxicité des NP 3 est peut-être due à la

l'organisation des polymères synthétisés par voie enzymatique, alors que les polymères synthétisés par voie chimique sont complètement amorphes.

Effet de la chiralité du MLABe sur la toxicité des nanoparticules correspondantes sur les cellules HepaRG

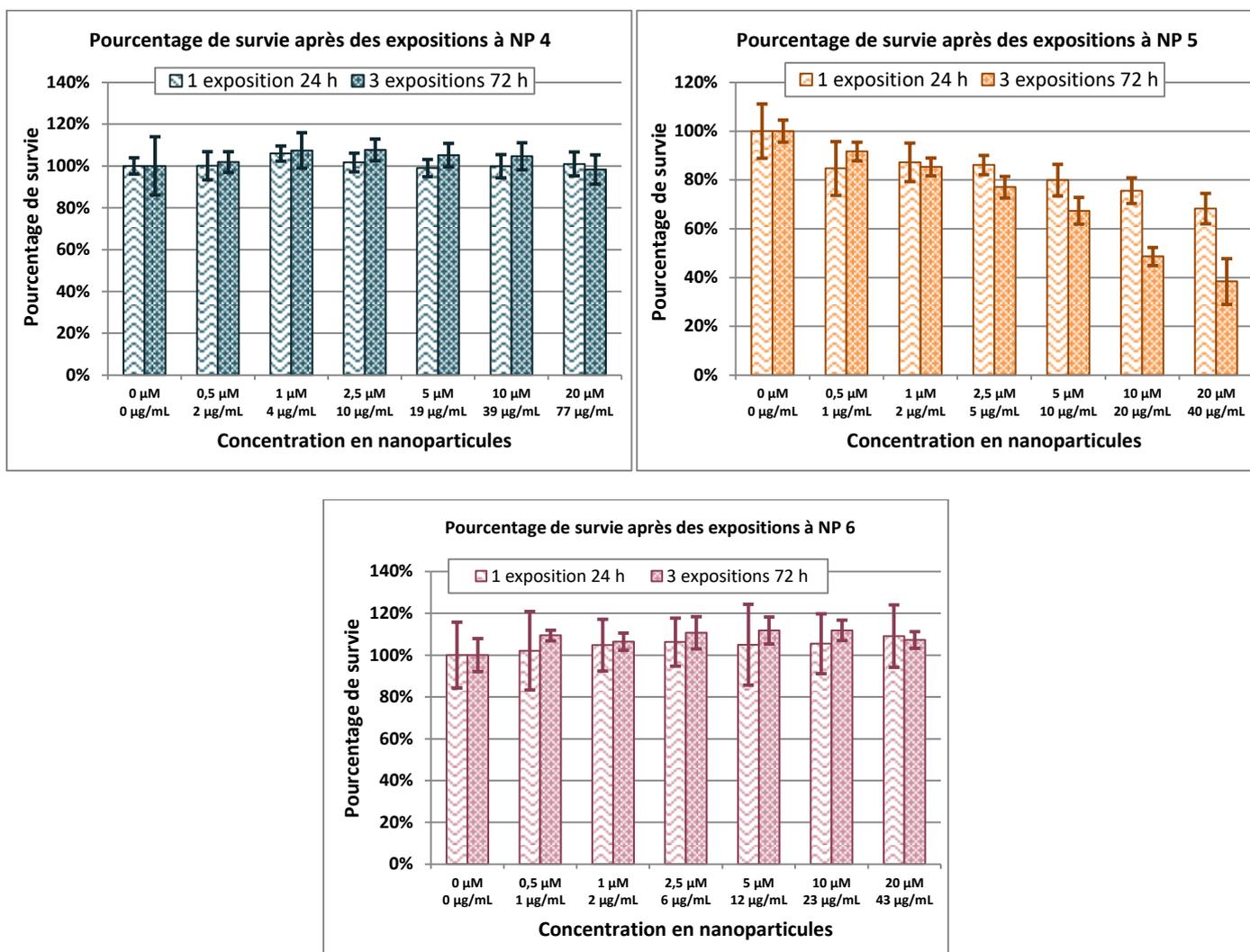


Figure 80 : Extrait de la Figure 77 illustrant l'effet de la chiralité du MLABe sur la toxicité des nanoparticules correspondantes

Les NP4, les NP5 et les NP6 sont toutes des formulations préparées à partir de polymères enzymatiques et ayant des masses molaires du même ordre de grandeur : 3 850 g/mol, 2 000g/mol et 2 300g/mol, respectivement. La différence entre ces trois formulations vient de la configuration du monomère utilisé lors de la synthèse des polymères. En effet, les polymères constituant les NP4 ont été synthétisés à partir du MLABe racémique, alors que les polymères constituant les NP5 sont synthétisés à partir du R-MLABe et ceux constituant les NP6 sont préparés à partir du S-MLABe.

Les résultats montrent que la formulation constituée par le polymère synthétisé à partir du R-MLABe est bien plus toxique que les deux autres. En effet, le taux de survie des cellules traitées avec les NP5 est très inférieur à ceux des cellules traitées avec les NP4 et les NP6. Cette toxicité est observée dès la première concentration (0,5 μM) avec un taux de survie de $85 \% \pm 11 \%$ après une exposition et de $92 \% \pm 4 \%$ après trois expositions. A la dose la plus forte (20 μM), le taux de survie n'est plus que de 68% après une exposition et de 38 % après 3 expositions. A cette même concentration, aucun effet notable n'est observé pour les deux autres formulations.

Cette toxicité liée au polymère préparé à partir du R-MLABe est confirmée par les mesures réalisées avec la formulation NP2, également constituée par un polymère synthétisé, par voie chimique, à partir de R-MLABe.

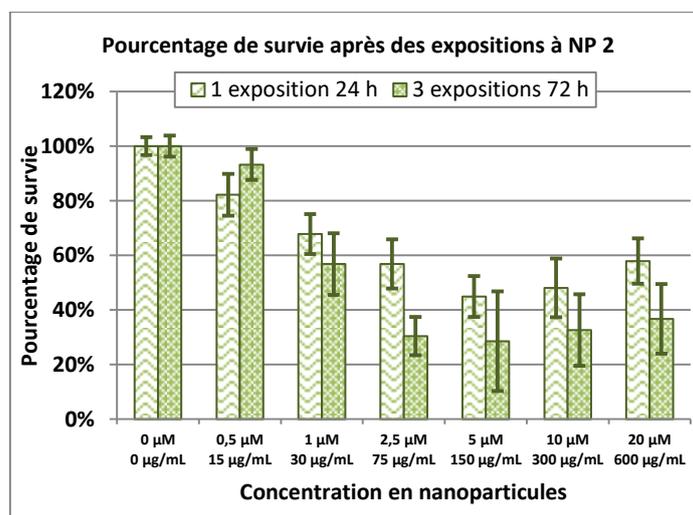


Figure 81 : Extrait de la Figure 77 illustrant la toxicité de NP2

Dans ce cas, la toxicité est encore plus marquée, avec un taux de survie de 30 % après 3 expositions aux NP2 à une concentration de 2,5 μM . La caractère toxique est peut être renforcé par l'effet de la masse molaire, comme expliqué précédemment. En effet, la masse molaire des polymères constituant les NP2 est 15 fois supérieure à celle des polymères formant les NP5. De plus, les tests de captation réalisés à 1 μM montrent que les NP2 sont également plus captées que les NP5 par les cellules.

Les valeurs aberrantes mesurées aux fortes concentrations sont probablement dues à la trop forte concentration en polymères. En effet, la concentration est telle qu'elle perturbe

probablement la lecture de la densité optique à partir de laquelle les taux de survie sont calculés.

Effet du PEG sur la toxicité des nanoparticules correspondantes sur les cellules HepaRG

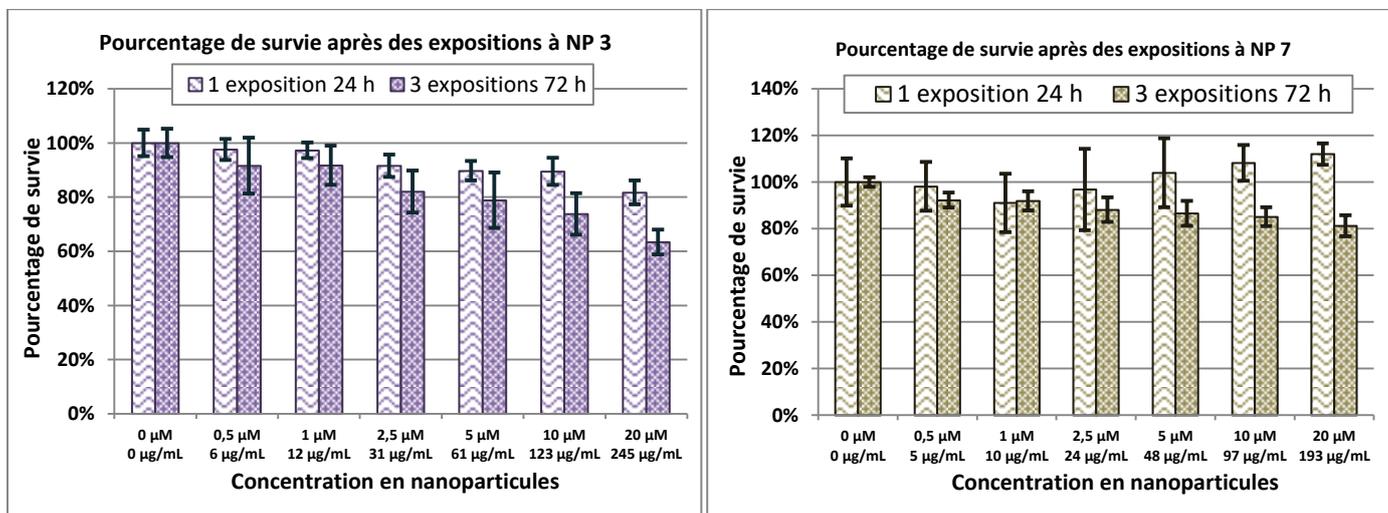


Figure 82 : Extrait de la Figure 77 illustrant l'effet du PEG sur la toxicité des nanoparticules correspondantes

Les polymères à la base des formulations NP3 et NP7 ont été synthétisés par voie enzymatique à partir du MLABe racémique, et ont des masses molaires voisines 12 250 g/mol et 9 650 g/mol, respectivement. La différence réside dans la présence d'un bloc hydrophile PEG pour les NP7, puisque le PEG a servi de macro-amorceur lors de la polymérisation enzymatique du MLABe. La formulation NP7 semble moins toxique que la formulation NP3. En effet, les taux de survie des cellules traitées avec les NP7 sont égaux ou supérieur à 100 % après une exposition, alors qu'ils baissent sensiblement pour les cellules traitées avec les NP3. Une toxicité est quand même observée après 3 expositions, puisque le taux de survie après exposition des cellules à une concentration de 20 μ M de nanoparticules est de 81 %. Toutefois, comme les tests de captation l'ont démontré, les nanoparticules NP7 sont moins bien internalisées que les autres formulations en raison du caractère furtif apporté par le bloc PEG. La différence de toxicité observée est donc peut-être due à la différence de captation des nanoparticules.

Deux formulations, sous certaines conditions, provoquent la mort de plus de 50% des cellules. Pour les NP2 et les NP5, il est donc possible de déterminer une IC₅₀. Ces concentrations ont été déterminées en linéarisant le taux de survie en fonction de la concentration dans la zone proche de l'IC₅₀ (Figure 83).

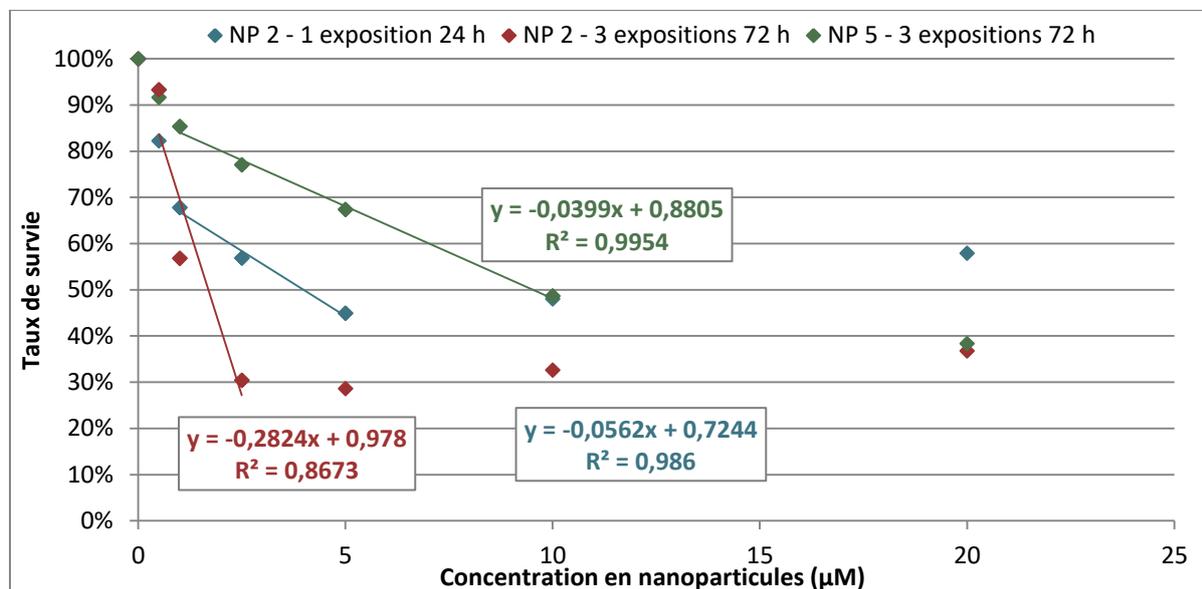


Figure 83 : Détermination des IC₅₀ pour deux formulations, NP2 et NP5.

Le Tableau 32 regroupe les valeurs des IC₅₀ obtenues à partir des équations de la Figure 83

Tableau 32 : Valeurs des IC₅₀ pour les NP 2 et les NP 5

Entrée	IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µg/mL)
NP 2 – 1 exposition 24 h	4	120
NP 2 – 3 expositions 72 h	2	60
NP 5 – 3 expositions 72 h	10	20

Les IC₅₀ obtenues prouvent que les nanoparticules NP2 et NP5, toutes les deux préparées à partir de polymères issus du R-MLABe, présentent une toxicité non négligeable.

Les clichés réalisés (Figure 84) sont en adéquation avec les tests d'activité MTT. La toxicité des NP2 est particulièrement visible sur ces clichés. En effet, après 24h d'exposition à NP2 (5 µM), la densité cellulaire est visiblement moindre que sur le contrôle. Cette différence est encore plus marquée après 72 h et une dose de 20 µM, où d'énormes agrégats de NP2 recouvrent la surface de culture et aucune cellule n'est visible.

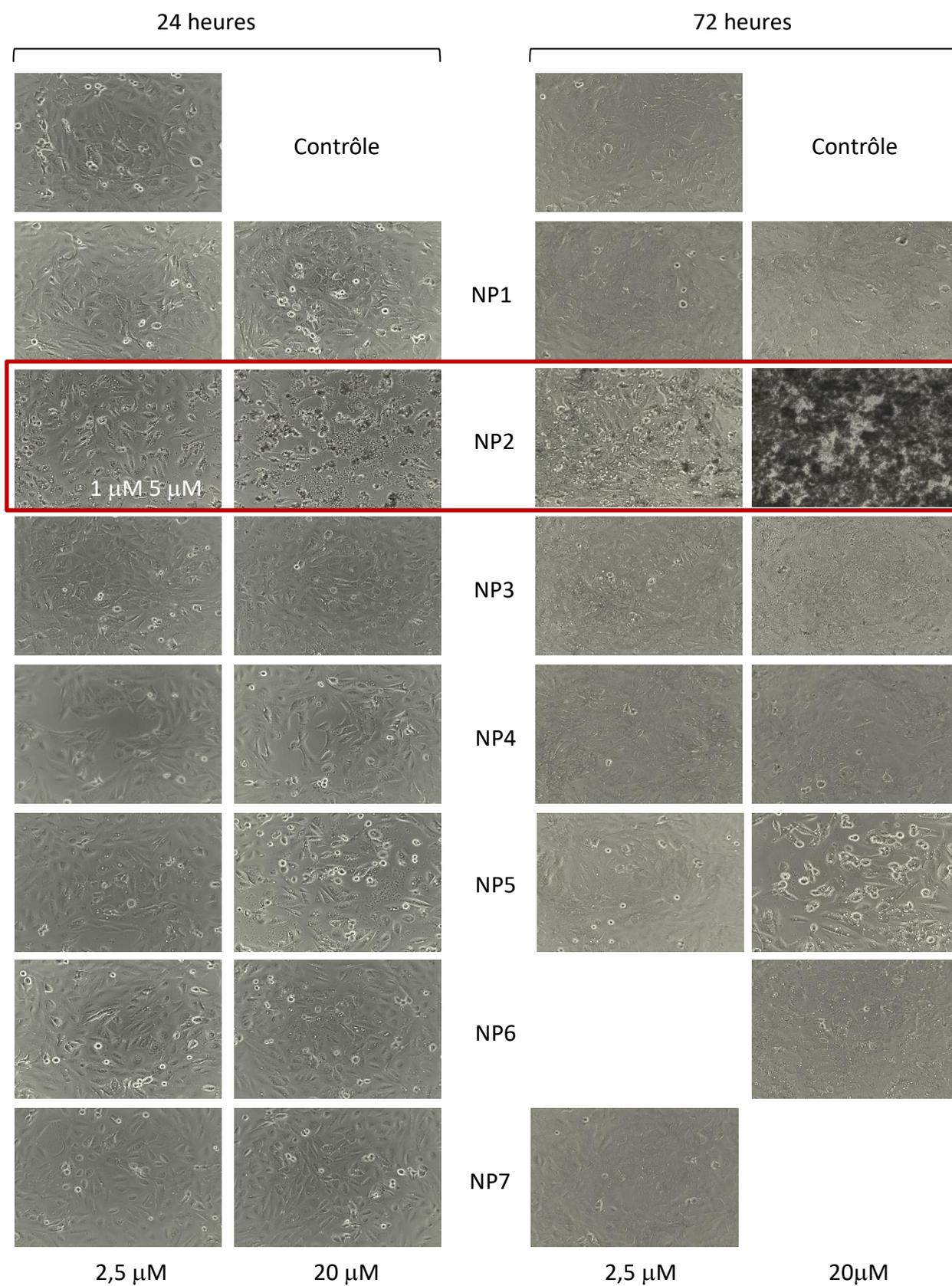


Figure 84 : Clichés des cellules HepaRG lors de l'étude de toxicité aigüe

4. Conclusions

De façon générale, les nanoparticules de PMLABe sont peu toxiques pour les cellules HepaRG puisque, malgré des doses relativement fortes (20 μ M), seules deux formulations présentent une IC₅₀ (les NP2 et les NP5).

Par ailleurs, l'étude de toxicité aiguë nous a permis d'étudier les effets de différents paramètres sur la toxicité des nanoparticules jusque-là peu décrit.

Ainsi, les résultats semblent indiquer que :

- La masse molaire des PMLABe formant les nanoparticules a un effet sur la toxicité. En effet, plus les polymères ont une masse molaire élevée, et plus les nanoparticules formulées à partir de ces polymères sont toxiques.
- Les nanoparticules préparées à partir de polymères synthétisés par voie enzymatique sont plus toxiques que celles constituées de polymères synthétisés par voie chimique.
- Les nanoparticules constituées par des polymères ayant été synthétisés à partir du *R*-MLABe sont beaucoup plus toxiques que les nanoparticules constituées par des polymères ayant été synthétisés à partir du MLABe racémique ou du *S*-MLABe.
- Les nanoparticules composées par un copolymère amphiphile ayant un bloc PEG sont un peu moins toxiques que les nanoparticules constituées par un PMLABe. Toutefois, cette différence peut être due à une différence de captation.

Cependant, il faut rappeler que ces résultats ont été obtenus à partir d'objets ayant des tailles anormalement élevées qui ont pu provoquer des difficultés dans les mesures de toxicité. Malgré tout, ils ouvrent des pistes intéressantes pour des recherches plus approfondies.

IV. Résultats de l'étude de toxicité chronique des nanoparticules sur les cellules HepaRG

1. Méthodologie de l'étude

Les cellules HepaRG ont été exposées à 7 reprises pendant 24h, pour chaque exposition, à une dose constante (1 μ M) de nanoparticules de PMLABe.

Le lendemain de l'ensemencement, le milieu de culture est remplacé par un milieu contenant les nanoparticules de PMLABe. Après 24h d'exposition, le milieu de culture est à nouveau remplacé par un milieu sans nanoparticules. Pendant 3 à 4 jours, les cellules ne subissent plus de traitement. Elles sont ensuite réexposées à une nouvelle dose de 1 μ M de nanoparticules. Ce cycle exposition/repos se répète pendant 27 jours en suivant le calendrier de la Figure 85. Après 14 jours, l'ajout de DMSO permet d'accélérer la différenciation, qui commence après 7 jours de culture lorsque les cellules sont à confluence.

Des tests de survie MTT ont été réalisés après chaque exposition, sauf pour la 6^{ème} exposition où un problème technique est survenu. Des clichés ont été pris, et des extractions d'ARN ont été réalisées après les 2^{ème}, 4^{ème} et 7^{ème} expositions, car ce sont des étapes importantes du cycle cellulaire. En effet, la fin de la 2^{ème} exposition correspond à la phase de croissance exponentielle des cellules HepaRG progénitrices. A la fin de la 4^{ème} exposition, les cellules ont commencé à acquérir des phénotypes différenciés. Après la 7^{ème} exposition, les cellules hépatiques différenciées ont acquis un métabolisme proche du foie *in vivo*.

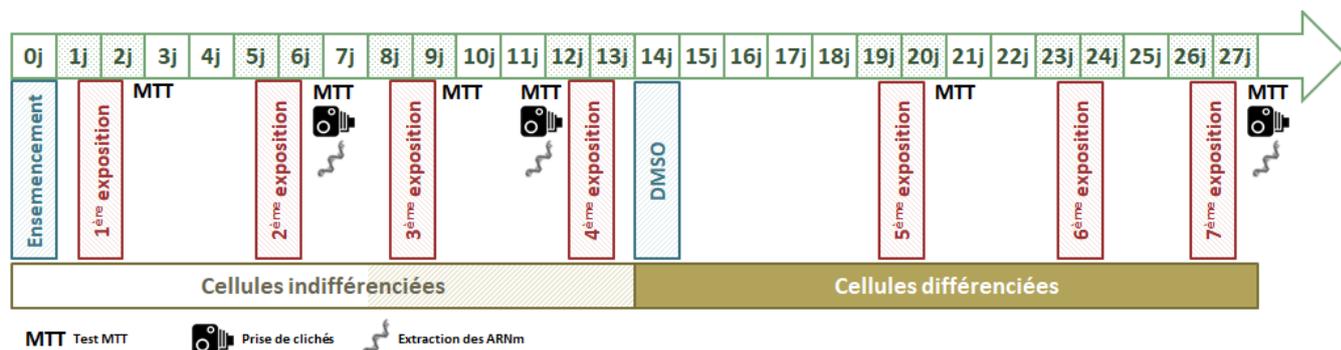


Figure 85 : Calendrier des expositions et des tests réalisés lors des tests de toxicité chronique

2. Formulation des nanoparticules

Les polymères de PMLABe ont été dissous dans du 1,4-dioxane, puis cette solution est additionnée rapidement dans de l'eau distillé. Après 10 min d'agitation, le 1,4-dioxane est évaporé sous pression réduite. La concentration finale en polymère est de 2,5 mg/mL.

Contrairement aux formulations précédentes, les polymères ont été précipités dans de l'eau distillée au lieu du tampon PBS. Les nanoparticules obtenues de cette façon ont des diamètres et des PDI plus petits. La concentration en nanoparticules dans le milieu de culture étant seulement de 1 μ M, il n'y a pas de risque de dilution des nutriments du milieu de culture, ni de changement d'osmolarité dus à l'eau apportée par la solution de nanoparticules. En effet, cela représente, pour le polymère ayant la masse molaire la plus élevée (cas le plus défavorable), seulement 1,2 % du volume total.

Le Tableau 33 regroupe les diamètres hydrodynamiques et les PDI, mesurés par DLS, des nanoparticules de PMLABe utilisées pour l'étude de la toxicité chronique.

Tableau 33 : Caractéristiques des nanoparticules utilisées lors de l'étude de toxicité chronique

Entrée	Monomère	Synthèse	D _h (nm)	PDI
NP1	RS-MLABe	chimique	72	0,18
NP2	R-MLABe	chimique	122	0,32
NP3	RS-MLABe	enzymatique	113	0,28
NP4	RS-MLABe	enzymatique	96	0,17
NP5	R-MLABe	enzymatique	121	0,19
NP6	S-MLABe	enzymatique	107	0,18
NP7	RS-MLABe / MeOPEGOH	enzymatique	83	0,17

Les diamètres hydrodynamiques mesurés sont proches de la centaine de nanomètres quel que soit le polymère utilisé lors de la formulation (diamètre moyen de 102 nm \pm 19 nm). Tous les PDI sont inférieurs à 0,3, ce qui indique une bonne répartition des tailles à l'exception de la formulation NP2, pour qui le PDI est légèrement supérieur à 0,3. Les formulations respectent toutes les conditions pour être utilisées pour ce test de toxicité chronique.

3. Tests MTT et suivi de DO

Les taux de survie ont été calculés pour chaque formulation et sont rassemblés dans la figure suivante.

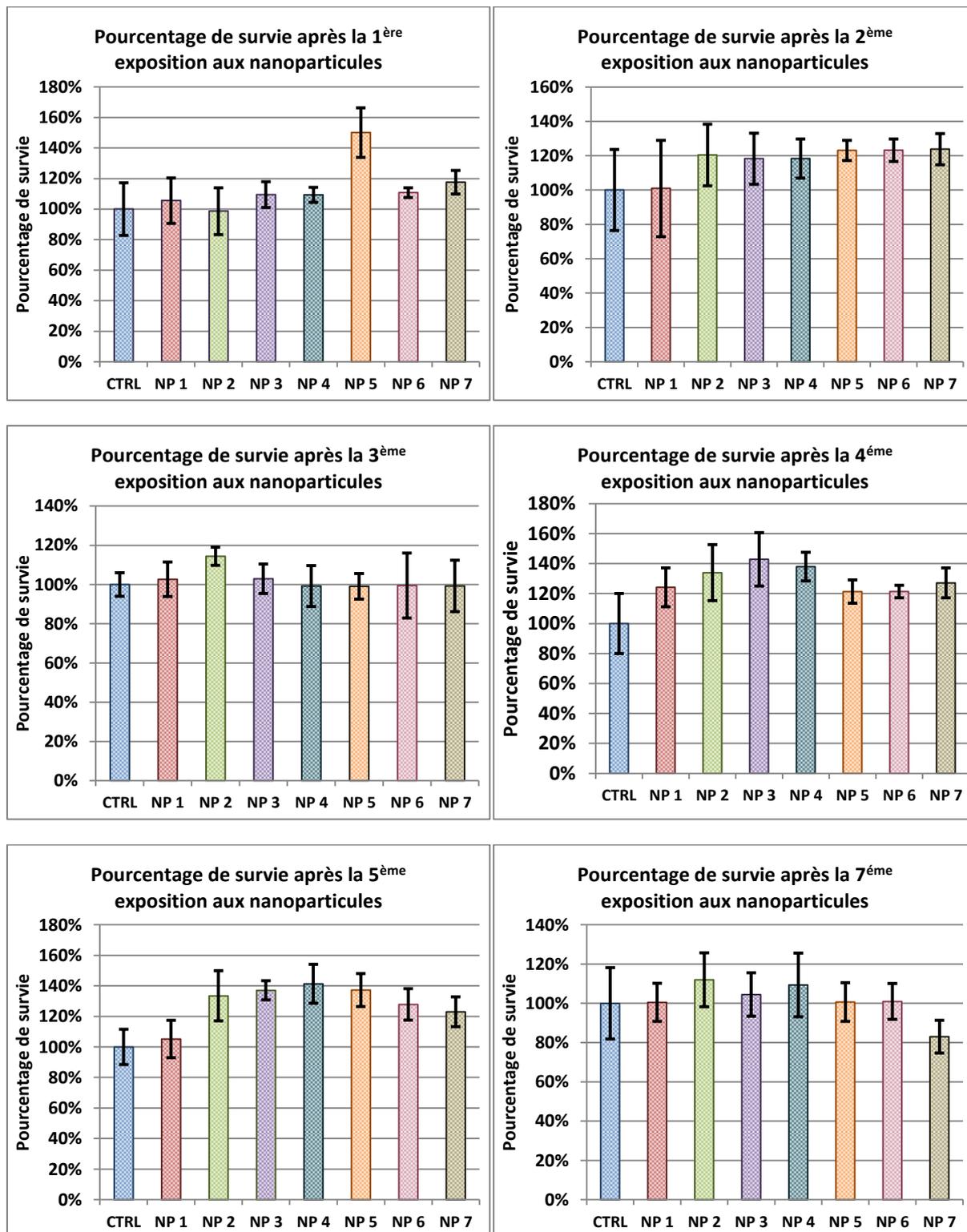


Figure 86 : Taux de survie des cellules en fonction du type de nanoparticules lors de l'étude de toxicité chronique

La Figure 86 représente les taux de survie des cellules en fonction du type de nanoparticules et du nombre d'expositions. Les résultats rassemblés dans cette figure indiquent que, dans ces conditions (faible dose et expositions multiples), les nanoparticules ne montrent pas de toxicité significative. Un effet bénéfique est même observé, comme précédemment lors des tests de toxicité aiguë, pour l'ensemble des nanoparticules. Par exemple, après la 5^{ème} exposition, le taux de survie des cellules ayant été traitées avec des nanoparticules est supérieur à 100 % atteignant même 141 % pour les NP4.

Ces résultats confirment en partie les résultats de la toxicité aiguë car, à cette concentration de 1 μ M, aucune formulation n'était toxique mis à part les NP2 et les NP5. La différence observée entre les deux études peut-être due à la différence des tailles des nanoparticules. En effet, lors de l'étude de toxicité aiguë, les objets avaient des tailles de l'ordre du micromètre alors que, pour l'étude de toxicité chronique, les objets ont des tailles de l'ordre de la centaine de nanomètres.

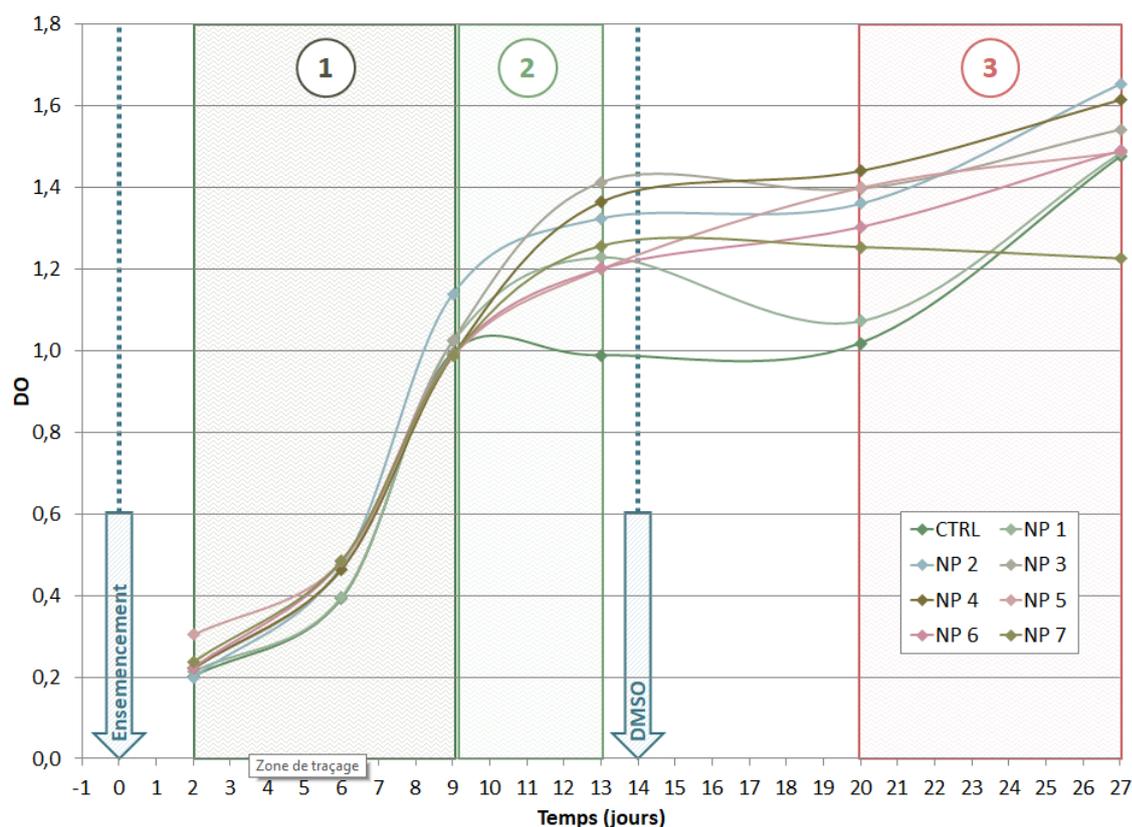


Figure 87 : Suivi de l'activité MTT au cours de l'étude de toxicité chronique

Le suivi de la densité optique absolue au cours du temps permet également de suivre l'évolution de l'activité MTT des cellules au fil des jours (Figure 87). En effet, la densité

optique mesurée lors des tests MTT est le reflet direct de l'activité cellulaire. En suivant son évolution au cours des 27 jours de l'expérimentation, nous obtenons des informations sur la quantité de cellules et l'activité métabolique globale au cours du temps. Ainsi, l'augmentation de la densité optique peut signifier deux choses :

- soit un nombre plus important de cellules (croissance),
- soit un nombre de cellules constant mais une activité cellulaire plus importante.

La Figure 87, représentant l'évolution de la densité optique au cours de l'étude en fonction des nanoparticules, est une illustration de ces deux cas. En effet, dans les premiers jours de culture (Figure 87, partie 1), les cellules sont en phase de croissance exponentielle, la densité optique est quasiment multipliée par six en une semaine. Au bout d'une semaine, les cellules arrivent à confluence, ralentissent leur cycle de prolifération et commencent à se différencier, la DO reste alors constante (Figure 87, partie 2). L'ajout de DMSO permet d'accélérer la différenciation et l'activité MTT est accrue, probablement en lien avec une activité mitochondriale qui augmente dans les hépatocytes différenciés⁴⁷. Lors de la dernière phase (Figure 87, partie 3), la DO augmente : les cellules étant déjà à confluence, la croissance cellulaire est inhibée. Par conséquent, cette augmentation est probablement liée au métabolisme général, et en particulier mitochondrial, qui est plus actif pour des cellules pleinement différenciées.

De plus, ces résultats sont en adéquation avec les taux de survie mesurés (Figure 86). En effet, ils confirment que les doses de nanoparticules ne sont pas cytotoxiques et n'altèrent pas, de façon importante, le fonctionnement global des cellules HepaRG.

Des clichés ont également été pris après les 2^{ème}, 4^{ème} et 7^{ème} expositions. Ces clichés montrent que la morphologie des cellules est correcte, et qu'il n'y a aucune altération significative due à la présence des nanoparticules (Figure 88).

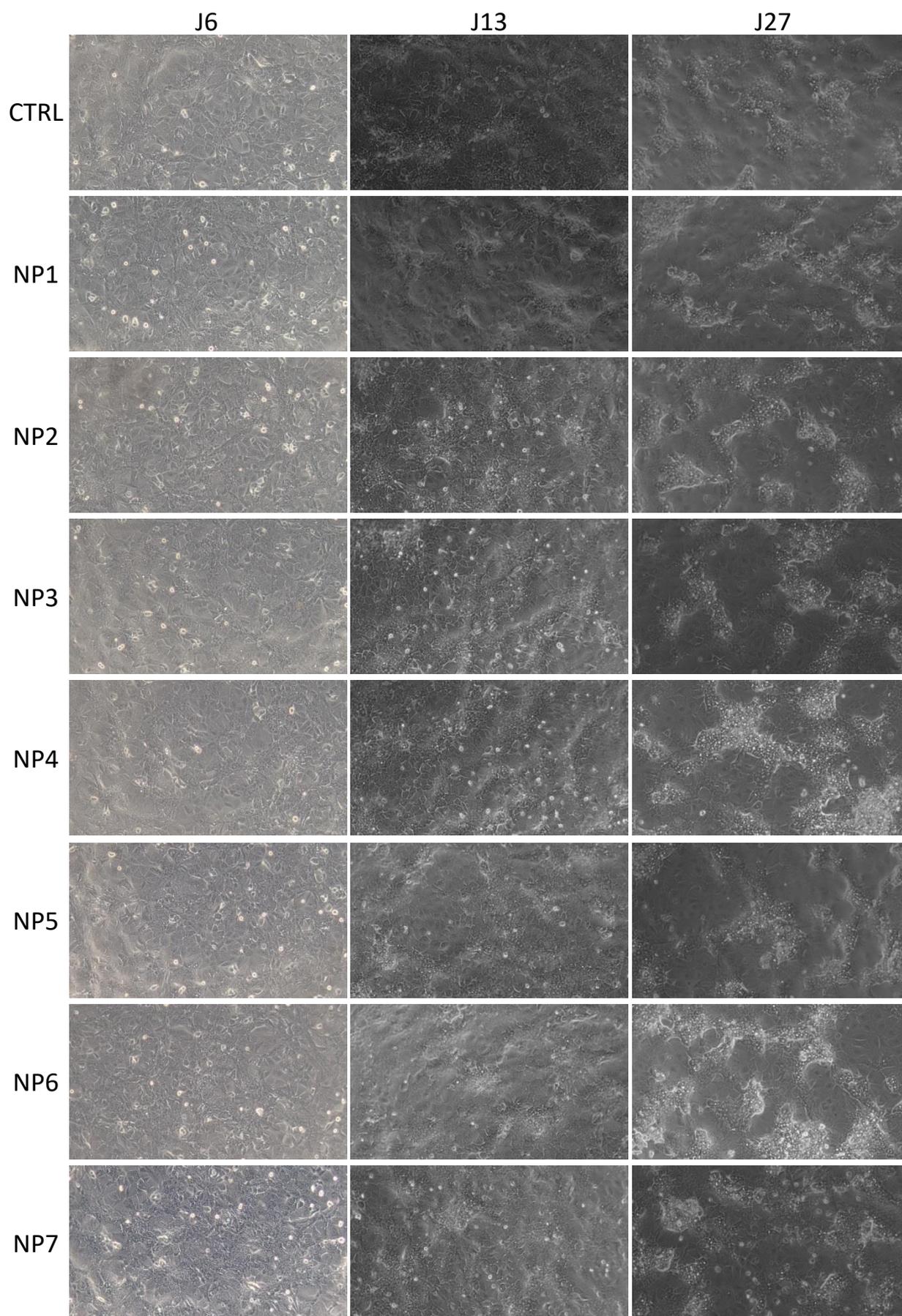


Figure 88 : Clichés des cellules HepaRG au cours de l'étude de toxicité chronique

En complément de ces tests d'activité MTT, la toxicité a été analysée plus finement grâce à l'extraction des ARNm.

4. Analyse des ARNm extraits lors de l'étude de toxicité chronique

Les ARN messagers ont été extraits à trois reprises lors de l'étude de toxicité chronique, après les 2^{ème}, 4^{ème} et 7^{ème} expositions (Figure 85), c'est-à-dire à des moments clés du cycle cellulaire. Une fois l'extraction et la purification des ARNm effectués, ceux-ci sont rétro-transcrits en ADN. Ensuite, l'ADN va être amplifié par PCR quantitative en sélectionnant des amorces de gènes ayant un intérêt pour l'étude. La PCR permet de quantifier l'expression d'un gène, et de déterminer si les traitements que la cellule a subis ont induit ou réprimé cette expression.

Neuf gènes ont été sélectionnés pour notre étude, leur nom et leur fonction sont regroupés dans le Tableau 34.

Tableau 34 : Gènes étudiés dans l'étude de toxicité chronique et leur rôle

Gène	Rôle	Fonction cellulaire de la protéine codée
CRP	Code pour la production de la protéine C réactive	La protéine C réactive est un marqueur biologique de l'inflammation. Son expression est proportionnelle au degré d'inflammation
CYP2E1	Code pour la production du cytochrome P450 2E1	Les cytochromes P450 sont des enzymes majeures de phase I de l'élimination des xénobiotiques. Ils participent à la fonctionnalisation des xénobiotiques par des réactions d'oxydo-réductions et d'hydrolyses
CYP3A4	Code pour la production du cytochrome P450 3A4	
UGT 1A1	Code pour la production de la protéine UDP-glycosyltransférase 1A1	Les UGT sont des enzymes qui catalysent les réactions de glucurono-conjugaisons : réactions majeures de la phase II de l'élimination des xénobiotiques
UGT 1A6	Code pour la production de la protéine UDP-glycosyltransférase 1A6	
UGT 1A9	Code pour la production de la protéine UDP-glycosyltransférase 1A9	
GSTA4	Code pour la protéine glutathion S-transférase A4	Les GST sont des enzymes qui catalysent les réactions de conjugaison du glutathion réduit avec le 4-hydroxynonéal. Ces protéines servent de marqueurs du stress oxydant
SOD2	Code pour la protéine superoxyde dismutase 2	La SOD2 est un marqueur du stress oxydant
xCT	Code pour la protéine de transport Cystine/Glutamate	La xCT est une protéine membranaire de transport impliquée dans le transfert de cystine et de glutamate en sens inverse (antiport).

Les résultats des analyses de l'expression des ARNm des gènes étudiés sont compilés dans la Figure 89

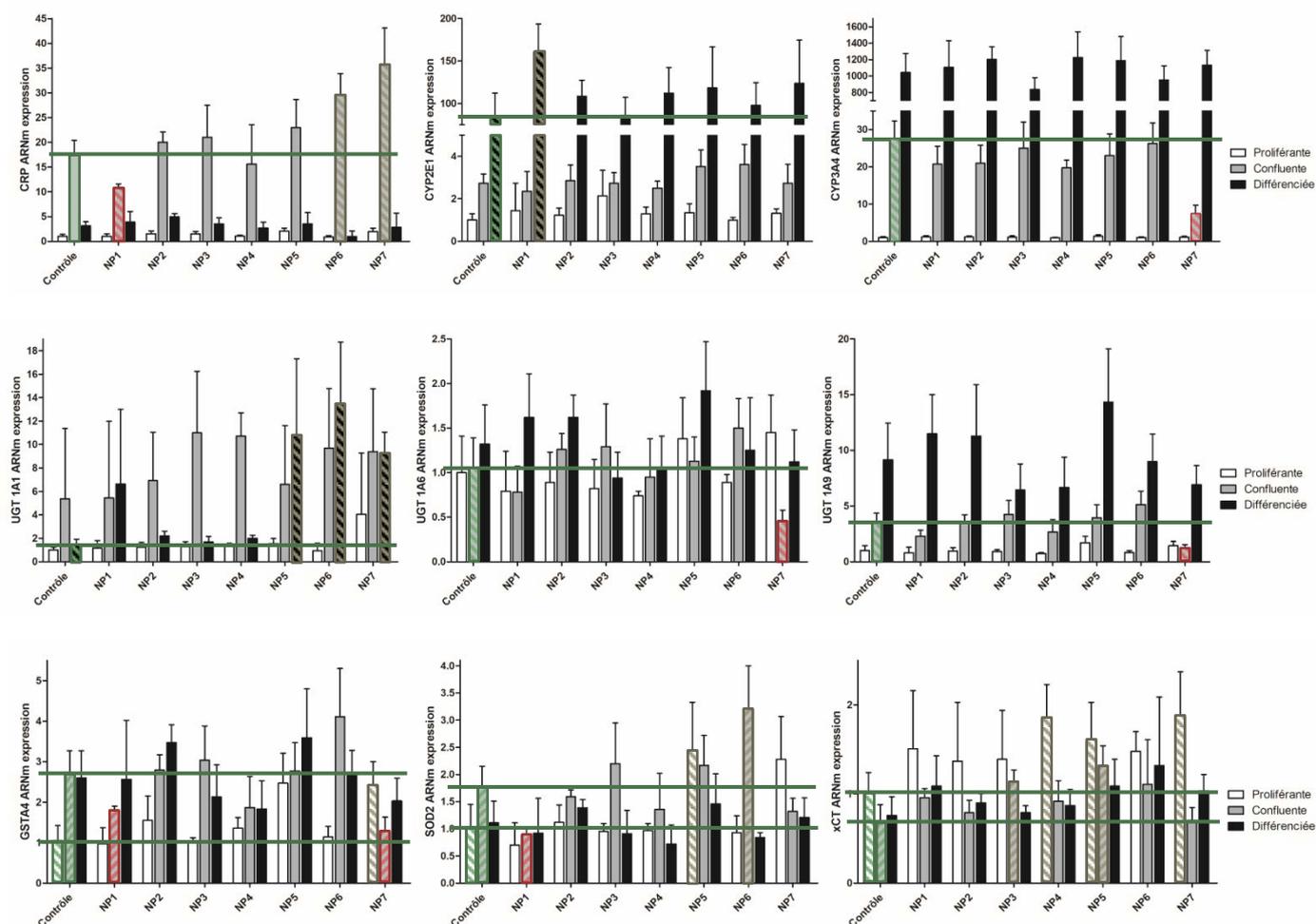


Figure 89 : Histogrammes présentant le niveau d'expression des ARNm pour les différents gènes étudiés en fonction du cycle cellulaire et du type de nanoparticules

Les histogrammes présentent le niveau d'expression des ARNm en fonction du gène étudié et du cycle cellulaire. Trois phases de ce cycle sont représentées. Nous distinguons les cellules proliférantes dont les ARNm ont été extraits après la 2^{ème} exposition (6 jours de culture), les cellules confluentes dont les ARNm ont été extraits après la 4^{ème} exposition (13 jours de culture) et les cellules différenciées dont les ARNm ont été extraits après la 7^{ème} exposition (27 jours de culture).

Pour étudier l'impact des traitements sur le fonctionnement cellulaire, il faut comparer les niveaux d'expression au même moment du cycle cellulaire, donc les cellules proliférantes avec les cellules proliférantes et ainsi de suite. Les variations d'expression des ARN entre des

cellules proliférantes et des cellules différenciées sont tout à fait normales et logiques car ces deux types de cellules ont des fonctionnements différents.

Sur la Figure 89, les lignes vertes représentent le niveau d'expression du contrôle, les barres rayées en brun représentent des niveaux d'expression statistiquement supérieurs au contrôle (induction) et les barres rayées en rouge représentent des niveaux d'expressions statistiquement inférieurs au contrôle (répression).

Les tableaux (Tableau 35, Tableau 36 et Tableau 37) compilent les résultats obtenus pour les trois types de cellules, les « + » représentent une induction de l'expression et les « - » représentent une répression de l'expression par rapport au contrôle. Les cases vides indiquent un niveau d'expression similaire au contrôle

Tableau 35 : Mesure de l'expression des ARNm pour les cellules proliférantes

Gène	NP 1	NP 2	NP 3	NP 4	NP 5	NP 6	NP 7
CRP							
CYP2E1							
CYP3A4							
UGT 1A1							
UGT 1A6							
UGT 1A9							
GSTA4							+
SOD2					+		
xCT				+	+		+

Tableau 36 : Mesure de l'expression des ARNm pour les cellules confluentes

Gène	NP 1	NP 2	NP 3	NP 4	NP 5	NP 6	NP 7
CRP	-					+	+
CYP2E1							
CYP3A4							-
UGT 1A1							
UGT 1A6							-
UGT 1A9							-
GSTA4	-						-
SOD2	-					+	
xCT			+		+		

Tableau 37 : Mesure de l'expression des ARNm pour les cellules différenciées

Gène	NP 1	NP 2	NP 3	NP 4	NP 5	NP 6	NP 7
CRP							
CYP2E1	+						
CYP3A4							
UGT 1A1					+	+	+
UGT 1A6							
UGT 1A9							
GSTA4							
SOD2							
xCT							

Les cellules traitées avec les nanoparticules, même si elles ne meurent pas, voient leur fonctionnement global altéré au fil des jours. En effet, l'expression de certains ARNm a été modulée par la présence de ces nanoparticules. Certaines formulations comme les NP2, les NP3 et les NP4 ont peu ou pas d'effets, alors que les NP2 et les NP4 sont très bien captées et que les NP2 présentent la toxicité aigüe la plus forte. Par contre, les NP7 ont provoqué une modification de l'expression de 8 ARNm différents (2 pour les cellules proliférantes, 5 pour les cellules confluentes et 1 pour les cellules différenciées). Les cellules confluentes ont vu leurs métabolismes d'élimination de phase I et II réprimés par les NP7 puisque les expressions des ARNm d'un cytochrome, de deux UGT et de la GSTA4, ont été réprimées. Le bloc PEG du copolymère semble donc avoir une influence importante sur le fonctionnement cellulaire, en plus des propriétés de furtivité.

Par contre, l'expression de l'UGT 1A1 des cellules différenciées a été induit à la fois par les NP5, les NP6 et les NP7. Cette induction est peut être le signe que l'accumulation des nanoparticules provoque une réaction de la cellule visant à les excréter.

Par ailleurs, les nanoparticules préparées à partir du PMLABe chimique (NP1) semblent modifier de façon plus importante le fonctionnement des cellules que les nanoparticules préparées à partir du PMLABe enzymatique (NP3). En effet, les NP1 répriment l'expression de 3 ARNm contre un seul pour les NP3.

5. Conclusions

Cette étude de toxicité chronique sur les nanoparticules préparées à partir des PMLABe, jamais réalisée avant ces travaux, a permis de mettre en évidence des modifications sur le fonctionnement global des cellules HepaRG. En effet, nous constatons que, même si les doses administrées ne provoquent pas de mort cellulaire (taux de survie supérieur ou égal à 100 %), la présence de nanoparticules module le fonctionnement des cellules HepaRG.

D'autres gènes sont encore à l'étude pour compléter cette étude de fonctionnement global. Ce travail ouvre les portes à de nombreux tests complémentaires qui ont pour objectif de comprendre l'influence de ces nanoparticules sur le métabolisme des cellules HepaRG. Des tests *in vivo* sont également envisagés sur les nanoparticules les plus intéressantes.

V. Conclusions des tests biologiques

L'influence de différentes formulations de nanoparticules, préparées à partir de sept polymères différents de PMLABe, ont été étudiées sur trois activités biologiques et les résultats ont été présentés dans ce chapitre:

- la captation des nanoparticules par les cellules progénitrices HepaRG,
- la toxicité aigüe à 1 et 3 jours des nanoparticules sur les cellules progénitrices HepaRG
- la toxicité chronique sur 27 jours des nanoparticules sur les cellules HepaRG.

L'étude de la captation des nanoparticules a montré qu'il y avait peu de différences sur l'internalisation des nanoparticules de PMLABe, quelle que soit la nature des polymères les constituant. Elle a confirmé les résultats déjà obtenus sur l'excellente captation des nanoparticules de PMLABe et la moins bonne captation des nanoparticules préparées à partir de copolymères contenant un bloc PEG^{35,46}.

L'étude de toxicité aigüe a confirmé et complété les résultats déjà obtenus quant à la faible toxicité des nanoparticules de PMLABe, en apportant une plus grande variété de nanoparticules de PMLABe utilisées. Ainsi, nous avons observé des différences de toxicité liées à la voie de synthèse (chimique versus enzymatique), à la masse molaire ou encore à la chiralité du monomère servant à la synthèse du polymère formant les nanoparticules.

Une analyse, par TEM, de la morphologie des différentes nanoparticules préparées dans le cadre de ce travail reste, néanmoins, obligatoire pour voir si la toxicité et la captation observées ne sont pas influencées par la morphologie des nanoparticules, elle-même dépendante de la nature du PMLABe utilisé.

L'étude de toxicité chronique a permis d'observer plus finement l'influence des traitements sur les cellules. Cette étude, jamais décrite dans la littérature, a permis de mettre en évidence que certaines nanoparticules (les NP7, en particulier) altéraient le fonctionnement global des cellules sans pour autant provoquer la mort cellulaire.

La Figure 90 rassemble les principaux résultats obtenus au cours de cette étude des activités biologique des nanoparticules de PMLABe sur les cellules hépatiques HepaRG.

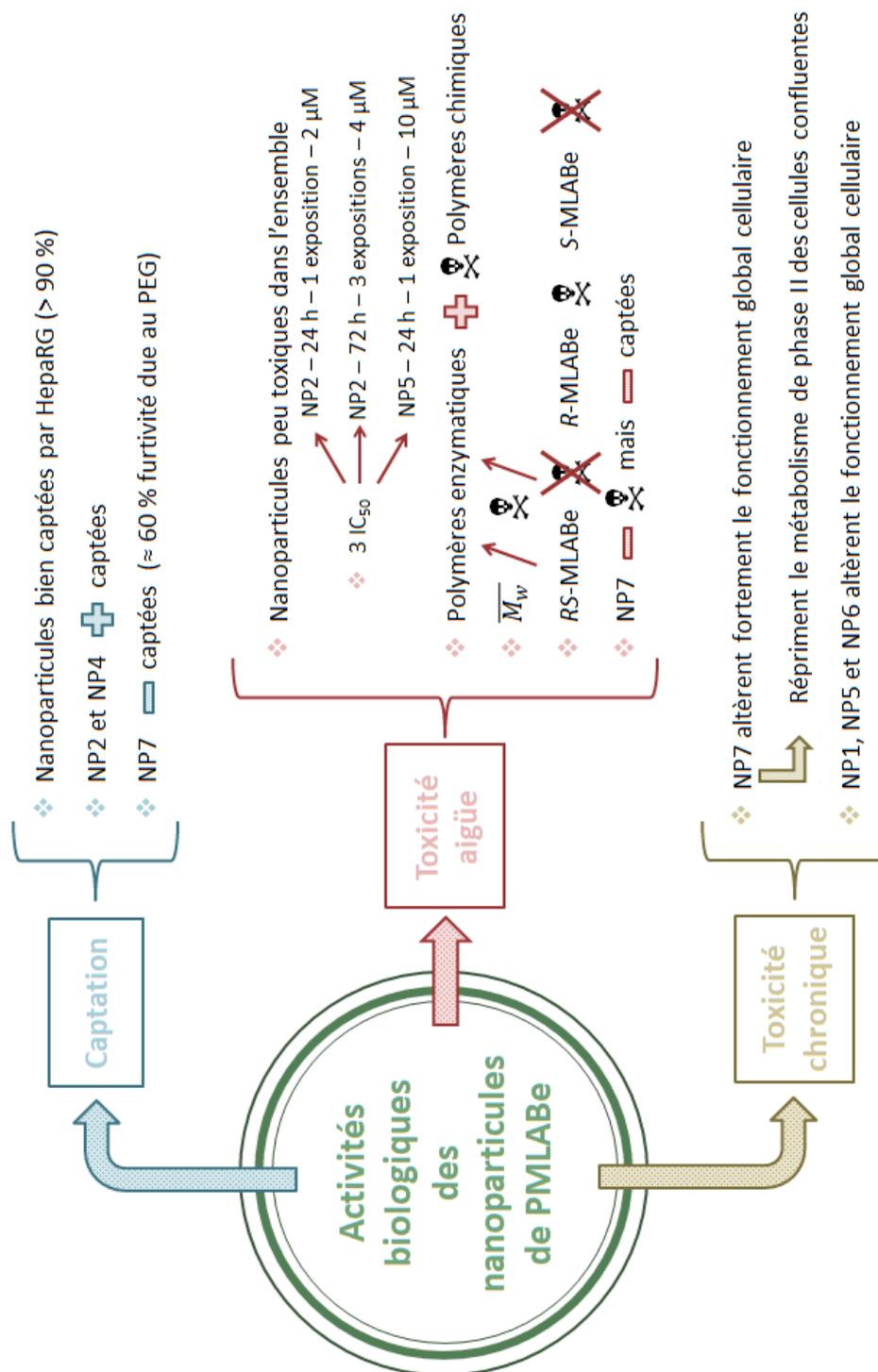


Figure 90 : Principaux résultats de l'activité des nanoparticules sur les cellules HepaRG

Références Bibliographiques

- (1) Strebhardt, K.; Ullrich, A. Paul Ehrlich's Magic Bullet Concept: 100 Years of Progress. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8* (6), 473–480 DOI: 10.1038/nrc2394.
- (2) Torchilin, V. P. Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4* (2), 145–160 DOI: 10.1038/nrd1632.
- (3) Hoffman, A. S. The Origins and Evolution of “Controlled” Drug Delivery Systems. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2008**, *132* (3), 153–163 DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.08.012.
- (4) Liu, S.; Maheshwari, R.; Kiick, K. L. Polymer-Based Therapeutics. *Macromolecules* **2009**, *42* (1), 3–13 DOI: 10.1021/ma801782q.
- (5) Malam, Y.; Loizidou, M.; Seifalian, A. M. Liposomes and Nanoparticles: Nanosized Vehicles for Drug Delivery in Cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30* (11), 592–599 DOI: 10.1016/j.tips.2009.08.004.
- (6) Misra, R.; Acharya, S.; Sahoo, S. K. Cancer Nanotechnology: Application of Nanotechnology in Cancer Therapy. *Drug Discov. Today* **2010**, *15* (19–20), 842–850 DOI: 10.1016/j.drudis.2010.08.006.
- (7) Etheridge, M. L.; Campbell, S. A.; Erdman, A. G.; Haynes, C. L.; Wolf, S. M.; McCullough, J. The Big Picture on Nanomedicine: The State of Investigational and Approved Nanomedicine Products. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2013**, *9* (1), 1–14 DOI: 10.1016/j.nano.2012.05.013.
- (8) Park, J. H.; Lee, S.; Kim, J. H.; Park, K.; Kim, K.; Kwon, I. C. Polymeric Nanomedicine for Cancer Therapy. *Prog. Polym. Sci. Oxf.* **2008**, *33* (1), 113–137 DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.09.003.
- (9) Kumari, A.; Yadav, S. K.; Yadav, S. C. Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *75* (1), 1–18 DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
- (10) Ulery, B. D.; Nair, L. S.; Laurencin, C. T. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2011**, *49* (12), 832–864 DOI: 10.1002/polb.22259.
- (11) Jin, S.-E.; Jin, H.-E.; Hong, S.-S. Targeted Delivery System of Nanobiomaterials in Anticancer Therapy: From Cells to Clinics. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 814208 DOI: 10.1155/2014/814208.
- (12) Tucker, B. S.; Sumerlin, B. S. Poly(N-(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide)-Based Nanotherapeutics. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (5), 1566–1572 DOI: 10.1039/C3PY01279D.
- (13) El-Say, K. M.; El-Sawy, H. S. Polymeric Nanoparticles: Promising Platform for Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2017**, *528* (1–2), 675–691 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.06.052.
- (14) Deshmukh, A. S.; Chauhan, P. N.; Noolvi, M. N.; Chaturvedi, K.; Ganguly, K.; Shukla, S. S.; Nadagouda, M. N.; Aminabhavi, T. M. Polymeric Micelles: Basic Research to Clinical Practice. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532* (1), 249–268 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.09.005.
- (15) Marguet, M.; Bonduelle, C.; Lecommandoux, S. Multicompartmentalized Polymeric Systems: Towards Biomimetic Cellular Structure and Function. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *42* (2), 512–529 DOI: 10.1039/C2CS35312A.
- (16) Ringsdorf, H. Structure and Properties of Pharmacologically Active Polymers. *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* **1975**, *51* (1), 135–153 DOI: 10.1002/polc.5070510111.
- (17) Duncan, R.; Vicent, M. J. Polymer Therapeutics-Prospects for 21st Century: The End of the Beginning. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (1), 60–70 DOI: 10.1016/j.addr.2012.08.012.
- (18) Duncan, R.; Vicent, M. J. Do HPMA Copolymer Conjugates Have a Future as Clinically Useful Nanomedicines? A Critical Overview of Current Status and Future Opportunities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (2), 272–282 DOI: 10.1016/j.addr.2009.12.005.
- (19) Kataoka, K.; Matsumoto, T.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Fukushima, S.; Okamoto, K.; Kwon, G. S. Doxorubicin-Loaded Poly(Ethylene Glycol)-Poly(Beta-Benzyl-L-Aspartate) Copolymer Micelles: Their Pharmaceutical Characteristics and Biological Significance. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2000**, *64* (1–3), 143–153.
- (20) Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. Block Copolymer Micelles for Drug Delivery: Design, Characterization and Biological Significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *47* (1), 113–131.
- (21) Kwon, G. S.; Kataoka, K. Block Copolymer Micelles as Long-Circulating Drug Vehicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16* (2–3), 295–309 DOI: 10.1016/0169-409X(95)00031-2.
- (22) Matsumura, Y.; Kataoka, K. Preclinical and Clinical Studies of Anticancer Agent-Incorporating Polymer Micelles. *Cancer Sci.* **2009**, *100* (4), 572–579 DOI: doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01103.x.
- (23) Cabral, H.; Kataoka, K. Progress of Drug-Loaded Polymeric Micelles into Clinical Studies. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2014**, *190*, 465–476 DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.06.042.

- (24) Kabanov, A. V.; Batrakova, E. V.; Melik-Nubarov, N. S.; Fedoseev, N. A.; Dorodnich, T. Y.; Alakhov, V. Y.; Chekhonin, V. P.; Nazarova, I. R.; Kabanov, V. A. A New Class of Drug Carriers: Micelles of Poly(Oxyethylene)-Poly(Oxypropylene) Block Copolymers as Microcontainers for Drug Targeting from Blood in Brain. *J. Controlled Release* **1992**, *22* (2), 141–157 DOI: 10.1016/0168-3659(92)90199-2.
- (25) Kabanov, A. V.; Nazarova, I. R.; Astafieva, I. V.; Batrakova, E. V.; Alakhov, V. Y.; Yaroslavov, A. A.; Kabanov, V. A. Micelle Formation and Solubilization of Fluorescent Probes in Poly(Oxyethylene-b-Oxypropylene-b-Oxyethylene) Solutions. *Macromolecules* **1995**, *28* (7), 2303–2314 DOI: 10.1021/ma00111a026.
- (26) Kabanov, A. V.; Batrakova, E. V.; Alakhov, V. Y. Pluronic Block Copolymers for Overcoming Drug Resistance in Cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54* (5), 759–779 DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.03.019.
- (27) Kabanov, A. V.; Batrakova, E. V.; Alakhov, V. Y. Pluronic Block Copolymers as Novel Polymer Therapeutics for Drug and Gene Delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2002**, *82* (2–3), 189–212 DOI: 10.1016/S0168-3659(02)00009-3.
- (28) Lehner, R.; Wang, X.; Marsch, S.; Hunziker, P. Intelligent Nanomaterials for Medicine: Carrier Platforms and Targeting Strategies in the Context of Clinical Application. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2013**, *9* (6), 742–757 DOI: 10.1016/j.nano.2013.01.012.
- (29) Vert, M.; Lenz, R. W. Preparation and Properties of Poly- β -Malic Acid: A Functional Polyester of Potential Biomedical Importance. *Polym. Preprints* **1979**, *20* (1), 608–611.
- (30) Cammas, S.; Béar, M. M.; Moine, L.; Escalup, R.; Ponchel, G.; Kataoka, K.; Guérin, P. Polymers of Malic Acid and 3-Alkylmalic Acid as Synthetic PHAs in the Design of Biocompatible Hydrolyzable Devices. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *25* (1–3), 273–282.
- (31) Cammas-Marion, S.; Guérin, P. Design of Malolactonic Acid Esters with a Large Spectrum of Specified Pendant Groups in the Engineering of Biofunctional and Hydrolyzable Polyesters. *Macromol. Symp.* **2000**, *153* (1), 167–186 DOI: 10.1002/1521-3900(200003)153:1<167::AID-MASY167>3.0.CO;2-Q.
- (32) Jaffredo, C. G.; Guillaume, S. M. Benzyl β -Malolactonate Polymers: A Long Story with Recent Advances. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (14), 4168–4194 DOI: 10.1039/C4PY00170B.
- (33) Loyer, P.; Cammas-Marion, S. Natural and Synthetic Poly(Malic Acid)-Based Derivates: A Family of Versatile Biopolymers for the Design of Drug Nanocarriers. *J. Drug Target.* **2014**, *22* (7), 556–575 DOI: 10.3109/1061186X.2014.936871.
- (34) Venkatraj, N.; Nanjan, M. J.; Loyer, P.; Chandrasekar, M. J. N.; Marion, S. C. Poly(Malic Acid) Bearing Doxorubicin and N-Acetyl Galactosamine as a Site-Specific Prodrug for Targeting Hepatocellular Carcinoma. *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.* **2017**, *28* (10–12), 1140–1157 DOI: 10.1080/09205063.2017.1311294.
- (35) Huang, Z. W.; Laurent, V.; Chetouani, G.; Ljubimova, J. Y.; Holler, E.; Benvegna, T.; Loyer, P.; Cammas-Marion, S. New Functional Degradable and Bio-Compatible Nanoparticles Based on Poly(Malic Acid) Derivatives for Site-Specific Anti-Cancer Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423* (1), 84–92 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.04.035.
- (36) Loyer, P.; Bedhouche, W.; Huang, Z. W.; Cammas-Marion, S. Degradable and Biocompatible Nanoparticles Decorated with Cyclic RGD Peptide for Efficient Drug Delivery to Hepatoma Cells in Vitro. *Int. J. Pharm.* **2013**, *454* (2), 727–737 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.05.060.
- (37) Vene, E.; Jarnouen, K.; Wei Huang, Z.; Wahib, B.; Montier, T.; Cammas-Marion, S.; Loyer, P. In Vitro Toxicity Evaluation and in Vivo Biodistribution of Polymeric Micelles Derived from Poly(Ethylene Glycol)-b-Poly(Benzyl Malate) Copolymers. *Pharm. Nanotechnol.* **2016**, *4* (1), 24–37 DOI: 10.2174/221173850401160413171933.
- (38) Thioune, O.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P.; Puisieux, F. Preparation of Pseudolatex by Nanoprecipitation: Influence of the Solvent Nature on Intrinsic Viscosity and Interaction Constant. *Int. J. Pharm.* **1997**, *146* (2), 233–238 DOI: 10.1016/S0378-5173(96)04830-2.
- (39) Martínez Rivas, C. J.; Tarhini, M.; Badri, W.; Miladi, K.; Greige-Gerges, H.; Nazari, Q. A.; Galindo Rodríguez, S. A.; Román, R. Á.; Fessi, H.; Elaissari, A. Nanoprecipitation Process: From Encapsulation to Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532* (1), 66–81 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.08.064.
- (40) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1–2), 55–63.
- (41) Moussard, C.; Tagu, D. *Principes des techniques de biologie moléculaire*; Institut national de la recherche agronomique (INRA): Paris, 2003.
- (42) Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L.; Duval, D. *Atlas de poche de pharmacologie*; Flammarion médecine-sciences: Paris, 2010.

- (43) Guillouzo, A.; Corlu, A.; Aninat, C.; Glaise, D.; Morel, F.; Guguen-Guillouzo, C. The Human Hepatoma HepaRG Cells: A Highly Differentiated Model for Studies of Liver Metabolism and Toxicity of Xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* **2007**, *168* (1), 66–73 DOI: 10.1016/j.cbi.2006.12.003.
- (44) Guguen-Guillouzo, C.; Guillouzo, A. General Review on In Vitro Hepatocyte Models and Their Applications. In *Hepatocytes: Methods and Protocols*; Maurel, P., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; pp 1–40.
- (45) Guterres, S. S.; Fessi, H.; Barratt, G.; Devissaguet, J.-P.; Puisieux, F. Poly (DL-Lactide) Nanocapsules Containing Diclofenac: I. Formulation and Stability Study. *Int. J. Pharm.* **1995**, *113* (1), 57–63 DOI: 10.1016/0378-5173(94)00177-7.
- (46) Barouti, G.; Khalil, A.; Orione, C.; Jarnouen, K.; Cammas-Marion, S.; Loyer, P.; Guillaume, S. M. Poly(Trimethylene Carbonate)/Poly(Malic Acid) Amphiphilic Diblock Copolymers as Biocompatible Nanoparticles. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22* (8), 2819–2830 DOI: 10.1002/chem.201504824.
- (47) Peyta, L.; Jarnouen, K.; Pinault, M.; Guimaraes, C.; Pais de Barros, J.-P.; Chevalier, S.; Dumas, J.-F.; Maillot, F.; Hatch, G. M.; Loyer, P.; Servais, S. Reduced Cardiolipin Content Decreases Respiratory Chain Capacities and Increases ATP Synthesis Yield in the Human HepaRG Cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2016**, *1857* (4), 443–453 DOI: 10.1016/j.bbabi.2016.01.002.

Experimental Part Chapter 3

I. General conditions

1. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy

NMR spectra are recorded on a Bruker Avance III 400 spectrometer operating at 400.13 MHz for ^1H , equipped with a BBFO probe with a Z-gradient coil and a GREAT 1/10 gradient unit. The standard temperature is adjusted to 298 K.

For polymers ^1H NMR spectra, relaxation delay d1 was set to 4 s given a repetition time between pulses of 8 s and 32 scans were performed.

2. Size Exclusion Chromatography

Mass average molar mass ($\overline{M_w}$) and dispersity ($\frac{\overline{M_w}}{\overline{M_n}} = \mathcal{D}$) values were measured by size exclusion chromatography (SEC) in THF at 40 °C (flow rate = 1.0 mL/min) on a GPC2502 Viscotek apparatus equipped with a refractive index detector Viscotek VE 3580 RI, a guard column Viscotek TGuard, Org 10x4.6mm, a LT5000L gel column (for samples soluble in organic medium) 300 x 7.8 mm and a GPC/SEC OmniSEC Software. The polymer samples were dissolved in THF (2 mg/mL). All elution curves were calibrated with polystyrene standards.

3. Dynamic Light Scattering

The size and polydispersity index (PDI) of the formulations were measured by dynamic light scattering using a Zetasizer Nano-ZR90 (Malvern) apparatus at 25°C, using a He-Ne laser at 633 nm and detection angle of 90 °. Datas were processed by the Zetasizer Software v7.11 (Malvern).

4. Flow cytometry

Flow cytometry was performed using a FACSCalibur (Becton Dickinson). Data were acquired on channel BV786-A to detect the DiR cellular uptake and analyzed using FACSDiva software (Becton Dickinson).

II. Polymer synthesis

1. Chemical synthesis of PMLABe ¹

The protocol used for these experiments was the same as the one described in the Experimental Part of the Chapter 2.

2. Enzymatic polymerization of PMLABe ²

The protocol used for these experiments was the same as the one described in the Experimental Part of the Chapter 1.

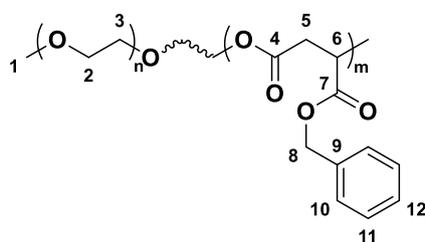
3. Enzymatic synthesis of PEG₇₃₆-*b*-PMLABe

Before the reaction, porcine pancreatic lipase (PPL) and the α -methoxy- ω -hydroxy-poly(ethylene glycol) MeOPEGOH ($\overline{M}_w = 736$ g/mol) were lyophilized 12 h.

In a 30 mL-tube, PPL (12.5 mg, 916 units) was mixed with 427 mg (2.07 mmol, 1eq.) of MLABe (protocol synthesis described in the Experimental Part of the Chapter 1), 77 mg (0.1 mmol, 0.05 eq) and anhydrous toluene (630 μ L). The reaction was performed at 60 °C, under orbital stirring (390 rpm), during 72 h.

The reaction was stopped by the addition of 5 mL of chloroform. The mixture was, then, transferred in Eppendorf tubes and centrifuged during 3 min at 14,000 rpm. Supernatants were filtered and the chloroform was evaporated under reduced pressure.

Polymer was dissolved in 1 mL of chloroform and then precipitated in a large excess of cold diethyl ether. After elimination of the supernatant, polymers were dried under reduced pressure at room temperature. Finally, 124.1 mg of a white powder was obtained giving a recovery yield of 25 %



¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ 7.57 – 7.07 (m, 5mH, H_{Ar}), 5.55 (m, 1mH, H₆), 5.16 (m, 2mH, H₈), 3.60 (m, 4nH, H_{2,3}), 3.24 – 2.67 (m, 2mH, H₅). $\overline{M}_{NMR} = 9,200$ g/mol

SEC (THF, 40 °C, 1 mL/min, polystyrene standards): $\overline{M}_w = 9,650$ g/mol; $\text{Đ} = 1.5$

III. Polymer formulation by nano-precipitation

The Table 3 shows the different characteristics of the polymers used during these studies

Table 3 : Characteristic of the polymers used

N°	Monomer	Synthesis	\overline{M}_w (g/mol)	\bar{D}	T_f (°C)	$[\alpha]_D^{25^\circ C}$
1	RS-MLABe	chemical	14,850	1.6	---	0
2	R-MLABe	chemical	30,000	N.D.*	151	-11
3	RS-MLABe	enzymatic	12,250	1.4	77	0
4	RS-MLABe	enzymatic	3,850	1.5	105	-3
5	R-MLABe	enzymatic	2,000	1.5	140	-11
6	S-MLABe	enzymatic	2,300	1.4	124	18
7	RS-MLABe / MeOPEGOH	enzymatic	9,650	1.5	N.D.*	N.D.*

*N.D.: not determined

1. Formulation for the uptake assays

Nanoparticles (NPs) loaded with 1,1''-dioctadecyl-3,3,3'',3''-tetramethylindotricarbocyanine iodide (DiR) were prepared using the following protocol. 5 mg the selected polymer (see Table 3), were dissolved in 100 μ L of DMF, then 50 μ L of DiR (1mg/mL in DMF), 1 % w/w with the polymer, were added. This solution was rapidly added into 2 mL of distilled water under vigorous stirring. The suspension was left under stirring during 1 h. Then, DiR-loaded nanoparticles were purified using a Sephadex steric exclusion column (PD-10 column) to eliminate free DiR. The concentration of loaded DiR was measured by UV at 670 nm on a solution prepared by mixing 80 μ L of the DiR-loaded nanoparticles with 320 μ L of DMF, and using a calibration curve of DiR solution in a mixture of DMF/H₂O (80/20). The absorbance of the solutions was measured using a Microplate Spectrophotometer powerwase XS/XS2 (Biotek), equipped with Gen5 Data Analysis Software (Biotek). The nanoparticles were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS) in water at room temperature with a concentration in polymer of 2.5 mg/mL.

2. Formulation for the acute toxicity

Nanoparticles for the acute toxicity studies were prepared using the following protocol. An amount of the selected polymer (see Table 3) (masses given for each polymer in Table 4) were dissolved in 1,4-dioxane in order to obtain a final concentration of 200 μ M in distilled water. This 1,4-dioxane solution was rapidly added a volume of distilled water under vigorous stirring (volumes given for each polymer in Table 4). After 15 min of stirring, the 1,4 dioxane was evaporated under reduced pressure at 40 °C. The final polymer concentration

was 200 μ M. The nanoparticles were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS) in water at room temperature.

Table 4 : Values of masses and volumes for each polymer to have a final concentration 200 μ M

N°	Monomer	Synthesis	\overline{M}_w (g/mol)	[C] ₀ (g/L)	Volume H ₂ O (mL)	Mass (mg)
1	RS-MLABe	chemical	14,850	2.97	2	5.9
2	R-MLABe	chemical	30,000	6	2	12
3	RS-MLABe	enzymatic	12,250	2.45	2	4.9
4	RS-MLABe	enzymatic	3,850	0.77	6	4.6
5	R-MLABe	enzymatic	2,000	0.4	10	4
6	S-MLABe	enzymatic	2,300	0.46	10	4.6
7	RS-MLABe / MeOPEGOH	enzymatic	9,650	1.93	3	5.8

3. Formulation for the chronic toxicity

Nanoparticles were prepared by the nanoprecipitation method as described by Fessi *et al.*³. 5 mg of the selected polymer (see Table 3), were dissolved in 5 mL of 1,4-dioxane. This solution was rapidly added into 2 mL of distilled water under vigorous stirring. The suspension was left under stirring during 15 min and the 1,4-dioxane was evaporated under reduced pressure at 40 °C. The final polymer concentration was 2.5 mg/mL. The nanoparticles were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS) in water at room temperature with a concentration in polymer of 2.5 mg/mL.

IV. Biological assays

1. HepaRG culture

For all the studies, proliferating progenitors HepaRG cells were cultured, as previously described⁴, in William's E medium (Lonza) supplemented with 2 mM of glutamine (Gibco), 5 mg/L of insulin (Sigma), 10⁻² mM hydrocortisone hemisuccinate and 10% of fetal calf serum (Lonza).

2. Formulation uptake assays

For the cell uptake assays, the 24 wells culture plates were seeded with HepaRG, with 10⁵ cells per well. Then, the NPs' preparations (1 μ M) or a negative control (buffer without NPs) were added to the wells. The cells were incubated 24 h at 37 °C. After incubation, the culture medium was removed; the cell monolayers were washed with PBS before the observation by fluorescence microscopy (Zeiss Inverted Microscope, Analysis Software AxioVision). Then, the cells were detached with trypsin and analyzed by flow cytometry (FAC- SCalibur Becton Dickinson) to quantify the fluorescence (Channel FL4H) emitted by the fluorescent NPs

captured by the cells. Cytometry data were analyzed using CellQuest software (Becton Dickinson).

3. Acute toxicity studies

HepaRG progenitors cells (10^4 cell per well) were incubated during 1 day (1 exposition) or 3 days (3 expositions) with nanoparticles (concentration ranging from 0.5 μM to 20 μM). For acute toxicity measurement after 3 days of incubation, the medium was renewed with fresh nanoparticles solution each 24 h, thus the cells were exposed to 3 doses of NPs. The cytotoxicity was assessed using the Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) assay⁵. At Day 1 and Day 3, MTT (0.25 mg/mL) in William's medium without fetal calf serum was added, and incubated for 2 h at 37 °C. The formazan crystals thus formed were dissolved in DMSO at room temperature for 5 min. The absorbance was measured at 595 nm with a microplate reader (Polarstar Omega, BMG Labtech). The MTT values, reflecting mitochondrial enzymatic activities which are directly correlated to the number of viable cells, were expressed in percentage relative to the absorbance measured in control cultures.

4. Chronic toxicity studies

In seven 96 wells microplates, HepaRG progenitors cells (10^4 cell per well) were incubated during 27 days and treated seven times (see planning in Figure 91) at 24h-exposition to 1 μM NPs. After 14 days, the culture media was supplemented with DMSO (2 % v/v). After each exposition, the cytotoxicity was assessed using MTT assay⁵, as described for acute toxicity.

In parallel, three 24 wells microplates were seeded with 50 000 cells per well and submitted at the same treatments. After the second, fourth and seventh exposition, cells were detached with trypsin for further RNA extraction.

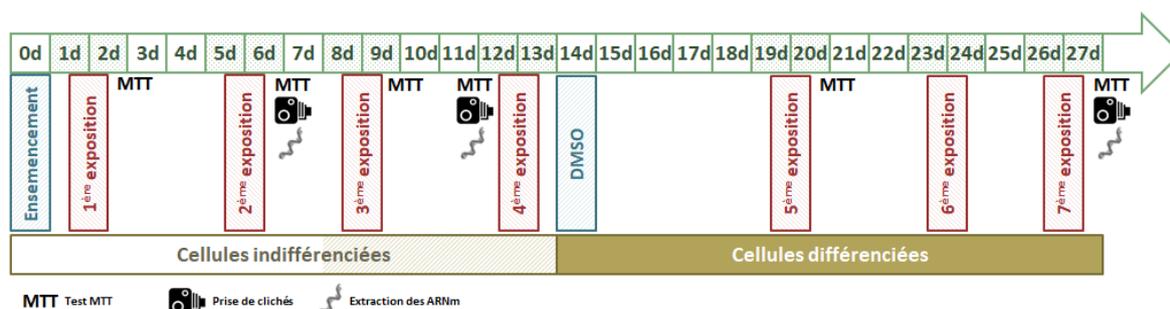


Figure 91 : Planning of the chronic toxicity studies

Cells were lysed in buffer RLT (Qiagen, Hilden, Germany) supplemented with 1% 2-mercaptoethanol. Total RNA was isolated using an RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen), according to the manufacturer’s protocol. RNA quantity and purity were assessed spectrophotometrically (Nanodrop ND-1000; Nyxor Biotech). Total RNA(1 µg) was reverse transcribed into first-strand cDNA using a High-Capacity cDNA Achieve Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) following the manufacturer’s procedure. qPCR was performed using the SybrGreen fluorescent dye methodology with SybrGreen PCR MasterMix and Step One Plus equipment (Applied Biosystems). Table 5 shows primer pairs for each transcript chosen with National Center for Biotechnology Information software.

Table 5 : Primer sequences used for RT-qPCR

Genes	Forward Primer	Reverse primer
CRP	GAACCTTCAGCCGAATACATCTTT	CCTTCCTCGACATGTCTGTCT
CYP2E1	TTGAAGCCTCTCGTTGACCC	CGTGGTGGGATACAGCCA
CYP3A4	CTTCATCCAATGGACTGCATAAAT	TCCCAAGTATAAACTCTACACAGACAA
UGT 1A1	TGACGCCTCGTTGTACATCAG	CCTCCCTTTGGAATGGCAC
UGT 1A6	CAGTGCCGTATGACCAAGAA	GTCTGAGGAGCAGTTAGGAATG
UGT 1A9	TGTCTTTAAACAACTCTGCAA	TGGAAAGCACAAGTACGAAGTATATA
GSTA4	GACGGGATGAAGTTGGTACAG	TCCACGTACATGTCAATCAGG
SOD2	GCATCTGGTGTCCAAGC	CGTGCTCCACACATCAATC
xCT	TGAAATCCCTGAACTTGGCAT	AGCTGACACTCATGCTATTTAGGAC

V. References

- (1) Cammas, S.; Renard, I.; Langlois, V.; Guerin, P. Poly(β -Malic Acid): Obtaining High Molecular Weights by Improvement of the Synthesis Route. *Polymer* **1996**, *37* (18), 4215–4220 DOI: 10.1016/0032-3861(96)00204-2.
- (2) Casajus, H.; Tranchimand, S.; Wolbert, D.; Nugier-Chauvin, C.; Cammas-Marion, S. Optimization of Lipase-Catalyzed Polymerization of Benzyl Malolactonate through a Design of Experiment Approach. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134* (11), n/a-n/a DOI: 10.1002/app.44604.

- (3) Thioune, O.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P.; Puisieux, F. Preparation of Pseudolatex by Nanoprecipitation: Influence of the Solvent Nature on Intrinsic Viscosity and Interaction Constant. *Int. J. Pharm.* **1997**, *146* (2), 233–238 DOI: 10.1016/S0378-5173(96)04830-2.
- (4) Laurent, V.; Glaise, D.; Nübel, T.; Gilot, D.; Corlu, A.; Loyer, P. Highly Efficient siRNA and Gene Transfer into Hepatocyte-Like HepaRG Cells and Primary Human Hepatocytes: New Means for Drug Metabolism and Toxicity Studies. In *Cytochrome P450 Protocols*; Phillips, I. R., Shephard, E. A., Ortiz de Montellano, P. R., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; Vol. 987, pp 295–314.
- (5) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1–2), 55–63.
- (6) Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* **2001**, *25* (4), 402–408 DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Cette thèse avait pour objectif d'étudier la polymérisation enzymatique de malolactonates, en présence de lipases, afin d'obtenir des dérivés du poly(acide malique). La volonté, de développer une voie de synthèse enzymatique alternative aux méthodes classiques, provient des applications biomédicales souhaitées pour ces polymères. En effet, le poly(acide malique) et ses dérivés, grâce à leurs remarquables propriétés de (bio)dégradabilité et de (bio)compatibilité, sont utilisés comme vecteurs de principes actifs, mais leur voie de synthèse classique met en jeu des amorceurs chimiques dont la présence, même à l'état de traces dans les matériaux finaux, peut être à l'origine d'effets toxiques.

Le premier objectif de ce travail était donc de prouver la faisabilité de cette synthèse enzymatique en obtenant des poly(malate de benzyle) répondant à un cahier des charges que nous avons établi en tenant compte des applications potentielles de ce type de polymères dans le domaine de la vectorisation de principes actifs.

Ainsi, notre travail a montré qu'il était possible d'obtenir des poly(malate de benzyle) avec une masse molaire supérieure à 10 000 g/mol et une dispersité de 1,5, le tout avec une conversion du monomère supérieure à 95 %. Pour parvenir à ce résultat, un plan d'expérience de 100 essais et l'extrapolation de celui-ci ont été nécessaires.

Fort de ce succès, nous nous sommes penchés sur les différences de propriétés physico-chimiques observées, entre les polymères synthétisés par voie chimique et ceux synthétisés par voie enzymatique. En effet, nous avons mesuré des températures de fusion pour les polymères synthétisés par voie enzymatique à partir de monomère racémique, semblant indiquer une organisation du polymère ; les polymères synthétisés par voie chimique à partir du même monomère n'ont pas de températures de fusion. Ce résultat surprenant nous a amenés à réfléchir sur le rôle de l'enzyme et sur son mécanisme d'action. En effet, comment la lipase de pancréas de porc provoque-t-elle cette organisation ? Quel type d'organisation possède ces polymères synthétisés par voie enzymatique ? A quel moment intervient-elle dans la réaction de polymérisation ? Quels acides aminés entrent en jeu et par quels mécanismes ? Les études effectuées n'ont, malheureusement, pas réussi à répondre avec

certitude à toutes les questions posées. Cependant, les résultats obtenus tendent à montrer que la polymérisation enzymatique du MLABe ferait intervenir une ouverture du cycle en « O-alkyle », tout comme ce qui est observé pour la polymérisation anionique par ouverture de cycle de ce même monomère en présence de sel de carboxylate comme amorceur. Cette conclusion implique que l'enzyme n'intervienne pas selon son mécanisme canonique d'hydrolyse des esters dans ce processus. Des études sont actuellement en cours pour confirmer notre mécanisme envisagé, faisant intervenir l'histidine plutôt que la sérine. De plus, deux études complémentaires sont envisagées :

- une étude par rayons X est envisagée pour déterminer les structures des polymères synthétisés par voie enzymatique
- une modélisation de docking, entre la lipase de pancréas de porc et le diméthylmalolactonate de benzyle, pour s'assurer que la non-polymérisation n'est pas due à l'encombrement stérique de la lactone et mais à l'absence de protons en α du carbonyle.

Finalement, nous nous sommes intéressés aux applications des différents polymères que nous avons synthétisés. En effet, nous voulions comparer les activités biologiques de différentes formulations (préparées soit avec des polymères chimiques, soit à partir de polymères enzymatiques) sur des cellules hépatiques HepaRG. Ainsi la captation, la toxicité aiguë et la toxicité chronique ont été étudiées sur un lot de sept formulations préparées à partir de sept polymères différents. Notre postulat de départ concernant une plus faible toxicité des formulations préparées avec les polymères enzymatiques s'est révélé inexact. Toutefois, l'étude a permis de mettre en relief certains paramètres de polymérisation pouvant jouer sur la toxicité des formulations correspondantes, tels la masse molaire des polymères et la configuration du centre asymétrique de la chaîne principale. L'étude de l'influence de la nature du polymère sur la morphologie des nanoparticules par TEM s'annonce très intéressante et, nous l'espérons, pourrait démontrer des relations entre la nature du polymère composant la nanoparticule – la morphologie de la nanoparticule – la captation et la toxicité de la nanoparticule. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives et les nanoparticules les plus intéressantes seront utilisées pour des tests *in vivo*.

Ainsi, tout au long de cette thèse, nous avons apporté des connaissances sur la polymérisation enzymatique des malolactonates en nous focalisant sur trois angles différents et complémentaires : la synthèse des polymères, la compréhension théorique du mécanisme réactionnel et l'étude des applications futures de ces polymères.

Ce travail se situe à l'interface de plusieurs domaines que sont la chimie des polymères, l'enzymologie, la vectorisation et la biologie cellulaire et c'est cette interdisciplinarité qui fait son originalité et sa richesse.

Abstract

Aliphatic polyesters, like poly(malic acid) and its derivatives, are a family of polymers with outstanding properties, such as bio(degradability) and bio(compatibility). Therefore, these polyesters can be considered as excellent candidates for the design of drug carriers. These kinds of polymers are usually synthesized thanks to polymerization reactions using organic, organometallic or metallic initiators or catalysts. The presence of such molecules, even in trace amounts, can cause undesired toxicities. Therefore, the use of biocatalysts, like lipases, is attracting more and more interest and research work to circumvent this problem. However, this enzymatic polymerization method has to face to other issues, such as a lower controlled of the polymerization process and polymers with lower molar masses.

Therefore, this PhD research work aimed at setting up the enzymatic polymerization of benzyl malolactonate, using porcine pancreatic lipase (PPL).

Firstly, we have optimized some reactional parameters allowing to obtain poly(benzyl malate), PMLABe, with molar masses adapted to their uses for the design of drug carriers, thanks to a Design of Experiments (DoE) and its extrapolation.

We were then interested by the comprehension of the enzymatic polymerization mechanism of the benzyl malolactonate. The different studies we carried out allowed us to deepen our knowledges of such enzymatic polymerization. Two non-canonical mechanisms were proposed and further experiments are in progress to confirm the one which is the more probable.

Finally, because our initial goal was to propose a more biocompatible polymerization method to obtain PMLABe free of traces of chemical initiator, we compared biologic activities of different nanoparticles prepared from PMLABe synthesized using chemical or enzymatic pathway. For that, we have first measured the uptake of these nanoparticles encapsulating a fluorescent dye, by the hepatic cells HepaRG. Then, we have studied the acute and chronic toxicity of the nanoparticles on the HepaRG cells. Results of these studies have highlighted that certain properties of the nanoparticles and/or of the polymers which constituted them have an influence on the cells viability and on the cells metabolism.

From the theoretical mechanism to the probable applications, this thesis brings knowledge about the enzymatic polymerization of substituted lactone, a field poorly described in the literature.

Keywords: Enzymatic polymerization, Lipases, Design of experiments, benzyl malolactonate, Poly(benzyl malate), Nanoparticles, Drug delivery systems, HepaRG hepatic cells line, Acute and chronic cytotoxicities, Cellular metabolism

Résumé

Les polyesters aliphatiques, comme le poly(acide malique) et ses dérivés, sont une famille de polymères aux propriétés de bio(comptabilité) et de bio(dégradabilité) remarquables, qui en font des candidats de choix pour l'élaboration de systèmes de vectorisation de principes actifs. Généralement, ces polymères sont synthétisés via des réactions de polymérisation utilisant des amorceurs, voir des catalyseurs, organiques, organométalliques ou métalliques. La présence de ces molécules, même à l'état de traces, peut être à l'origine d'une toxicité non souhaitée. Par conséquent, l'utilisation de biocatalyseurs, comme les lipases, se développe pour apporter une solution à cet inconvénient. Cependant, cette voie de synthèse enzymatique fait face à d'autres problèmes, tels qu'une polymérisation moins bien maîtrisée et des polymères de masses molaires faibles.

Cette thèse a donc pour objectif de mettre au point une voie de polymérisation du malolactonate de benzyle utilisant la lipase de pancréas de porc (PPL) comme amorceur.

Dans un premier temps, nous avons optimisé certains paramètres réactionnels permettant d'obtenir des poly(malate de benzyle), PMLABe, de masses molaires suffisamment élevées pour que ces polymères puissent être utilisés dans la formulation de vecteurs de principes actifs, grâce à l'utilisation et l'extrapolation d'un plan d'expérience.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la compréhension du mécanisme réactionnel de la polymérisation enzymatique du malolactonate de benzyle, une β -lactone β -substituée. Les différentes études menées ont permis d'approfondir notre connaissance dans ce domaine. Deux mécanismes ont été proposés et des expériences sont en cours pour confirmer l'un d'entre eux.

Finalement, comme l'objectif initial est de proposer une méthode de synthèse de dérivés du PMLA plus biocompatibles conduisant à des polymères sans résidus d'amorceurs chimiques toxiques, nous avons comparé les activités biologiques de nanoparticules préparées à partir de PMLABe synthétisés par voie chimique et par voie enzymatique. Pour cela, nous avons mesuré la captation de ces nanoparticules, encapsulant une sonde de fluorescence, par des cellules hépatiques HepaRG. Puis, nous avons évalué la toxicité aiguë et la toxicité chronique de ces nanoparticules vis-à-vis des cellules HepaRG. Ces études ont permis de mettre en évidence certaines propriétés des nanoparticules ayant une influence sur la survie cellulaire et le métabolisme des cellules HepaRG.

De la compréhension théorique aux applications potentielles, cette thèse apporte des connaissances sur la polymérisation enzymatique des lactones substituées, un domaine peu décrit dans la littérature.